



TESIS DE DOCTORADO

ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN EL CULTIVO DE LA PATATA (*Solanum tuberosum* L.)

Daniel Mouzo Calzadilla

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN DEL MEDIO
NATURAL. DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA, GENÉTICA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA.
FACULTAD DE BIOLOGÍA.

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN EL CULTIVO DE LA PATATA (*Solanum tuberosum* L.)

D. Daniel Mouzo Calzadilla

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, ... de de 2020

Fdo.: Daniel Mouzo Calzadilla





AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES / TUTORES DE LA TESIS

ESTUDIOS PROTEÓMICOS EN EL CULTIVO DE LA PATATA (*Solanum tuberosum* L.)

D. **José Carlos Zapata Babío**, Catedrático de Genética del Departamento de Zoología, Genética y Antropología Física y D. **Lucio García Calvo**, Jefe de investigación en tecnología agronómica del CTC, Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. **Daniel Mouzo Calzadilla**, bajo su dirección, y autorizan su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, ... de de 2020

Fdo.: José Carlos Zapata Babío

Fdo.: Lucio García Calvo



AGRADECIMIENTOS

Ha sido un largo camino el que me ha traído hasta aquí. Por ese motivo, es momento de mirar atrás y agradecer a todas las personas con las que he ido de la mano y las que han conseguido aplanar las pendientes más empinadas. En primer lugar, quiero agradecer a mis directores: el Catedrático D. Carlos Zapata y D. Lucio García, gracias a los cuales todo esto ha sido posible. Ellos me presentaron una línea de investigación que me ha apasionado desde el primer día y me han enseñado el rigor y la dedicación necesaria con la que aportar nuestro granito de arena a este campo. Especialmente agradecer a Carlos por toda su ayuda y su amplia experiencia, la cual ha sabido transmitirme tanto en lo profesional como en lo personal.

Agradezco enormemente a mis compañeras del laboratorio. María, pese a haber dicho que eras la madre del grupo, por tu cercanía creo que en realidad eres como una hermana mayor. Nunca podré olvidar todas las frases que tanto me ayudaron y las cuales aún guardo como tesoros de sabiduría en frascos pequeños. Gracias por todo lo que me has enseñado y cuidado en este tiempo. A Raquel, qué decir cuando ya pensamos como una única persona. Nuestra partida de ajedrez aún no ha terminado, pero ya sé de antemano que los dos saldremos ganando. Ojalá seguir trabajando codo con codo durante muchos años más. A Ariadna y Javier, os habéis ido un poco antes del laboratorio pero no de mi memoria, gracias por recibirme con los brazos abiertos cuando llegué. Ari, aún sigo recordando los primeros días cuando tuviste que preparar dos veces la misma disolución, ya sabes que era *brominola*. Javi, me ha encantado compartir horas y horas de charlas con diferentes puntos de vista y gracias por enseñarme que todos los procesos siguen el mismo esquema: sota, caballo y rey.

A mi familia y amigos/as con los/as que he realizado otro viaje en paralelo. Han pasado demasiadas cosas como para condesarlas en unas pocas frases. Pero lo que más agradezco es que en cada una de ellas me he sentido arropado en todo momento. Muchísimas gracias.

DANIEL MOUZO CALZADILLA

Este trabajo fue financiado por el programa CASTES de la
Consellería do Medio Rural de la Xunta de Galicia



ABREVIATURAS

2-DE: Electroforesis bidimensional (*Two-Dimensional Electrophoresis*)

9-HPODE: Ácido (9S, 10E, 12Z) -9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoico ((9S,10E,12Z)-9-hydroperoxy-10,12-octadecadienoic acid)

AAC: Translocasa ADP, ATP (*ADP, ATP Carrier protein*)

ABA: Ácido abscísico (*Absciscic Acid*)

AOS3: Óxido de aleno sintasa 3 (*Allene Oxide Synthase 3*)

API: Inhibidor de aspartato proteasa (*Aspartic Protease Inhibitor*)

CAT: Catalasa (*Catalase*)

CI: Intervalo de confianza (*Confidence Interval*)

CIPC: Clorpropham (*Chlorpropham*)

CV: Coeficiente de variación (*Coefficient of Variation*)

D: Distancia proteómica (*Proteomic Distance*)

DTT: Ditioneitol (*Dithiothreitol*)

EAA: Aminoácidos esenciales (*Essential Amino Acid*)

EAAI: Índice de aminoácidos esenciales (*Essential Amino Acid Index*)

ESI: Ionización por electroespray (*Electrospray Ionization*)

EST: Marcador de secuencia expresada (*Expressed Sequence Tag*)

FDR: Tasa de falsos positivos (*False Discovery Rate*)

FRK: Fructoquinasa (*Fructokinase*)

GA: Ácido giberélico (*Gibberellic Acid*)

HF-P: Fluorhídrico piridina (*Hydrogen Fluoride-Pyridine*)

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento (*High-Performance Liquid Chromatography*)

IEF: Isoelectroenfoque (*Isoelectrofocusing*)

IMAC: Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*)

IPG: Gradiente de pH inmovilizado (*Immobilized pH Gradient*)

LAH: Lípido acil hidrolasa (*Lipid Acyl Hydrolase*)

LC-MS/MS: Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

LOX: Lipoxigenasa (*Lipoxygenase*)

MALDI: Desorción / Ionización láser asistida por matriz (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

MAS: Selección asistida por marcador (*Marker-Assisted Selection*)

***M_r*:** Masa molecular relativa (*Relative molecular mass*)

MS: Espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)

NEEA: Aminoácidos no esenciales (*Nonessential Amino Acids*)

PCA: Análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis*)

PDCAAS: La puntuación de los aminoácidos corregida por la digestibilidad de la proteína (*Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score*)

pI: Punto isoeléctrico (*Isoelectric Point*)

PR: Ratio de fosforilación (*Phosphorylation Rate*)

PTM: Modificación postraducciona (*Post-Translational Modification*)

PUFAS: Ácidos grasos poliinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*)

QTL: Loci de caracteres cuantitativos (*Quantitative Trait Loci*)

RC: Cambio Relativo (*Relative Change*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (*Sulphate Dodecyl Sodium- Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SE: Error estándar (*Standard Error*)

SNP: Polimorfismo en nucleótido individual (*Single Nucleotide Polymorphism*)

SPI: Inhibidor de serina proteasa (*Serine Protease Inhibitor*)

SSP: Proteína de almacenamiento de semilla (*Seed Storage Protein*)

TCTP: Homólogo de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (*Translationally-Controlled Tumor Protein homolog*)

TOF: Tiempo de vuelo (*Time of Fly*)

UPGMA: Método de agrupación por pares con promedio aritmético no ponderado (*Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Mean*)

VSP: Proteína de almacenamiento vegetativa (*Vegetative Storage Protein*)





RESUMEN



RESUMEN

La patata (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes para la alimentación humana que proporciona rendimientos muy superiores al resto de los cultivos de mayor producción. La cantidad de proteína en el tubérculo de patata es relativamente escasa en comparación con la de otros cultivos, pero de muy alta calidad nutricional, comparable a la de la proteína modelo del huevo. Dentro de su proteoma, las proteínas de reserva desempeñan un papel clave tanto en la reproducción y desarrollo de la planta como en la calidad nutricional de la proteína total del tubérculo de patata. La principal proteína de reserva es la patatina ya que representa casi la mitad de la proteína soluble total. Los estudios proteómicos previos en patata se han centrado principalmente en el análisis de las proteínas de reserva durante el desarrollo y brotación del tubérculo. Sin embargo, los trabajos orientados al estudio del proteoma global de la patata son todavía muy escasos en la actualidad. Este trabajo tiene por objetivos principales la evaluación bibliográfica de los avances en el conocimiento de la biología de las proteínas de reserva de semilla seca y vegetativa logrados mediante la aplicación de la electroforesis bidimensional (2-DE) acoplada a la espectrometría de masas (MS) y su repercusión en la mejora de los cultivos; el estudio de los perfiles electroforéticos bidimensionales de las múltiples isoformas de patatina como posibles marcadores de las variedades de patata y de parámetros de calidad; y el análisis de los cambios del proteoma global asociados con la longitud de la duración de la dormancia del tubérculo basado en las tecnologías proteómicas 2-DE y LC-Triple-TOF/MS. Los resultados del estudio de revisión revelaron que la 2-DE ha desempeñado un papel clave en los avances producidos en el conocimiento de la biología de las proteínas de reserva y diversas áreas de aplicación, tales como, la caracterización molecular de sus múltiples isoformas y modificaciones postraduccionales, el papel diferencial de las isoformas durante el

desarrollo y germinación de las semillas y sus efectos en la calidad proteica y longevidad de la semillas. Por otra parte, el análisis de la diversidad de las isoformas de patatina en un total de 15 variedades comerciales de patata mediante la 2-DE, mostró que los perfiles bidimensionales de la patatina son únicos para cada una de las variedades estudiadas y que las distancias proteómicas entre variedades guardan relación estadísticamente significativa con las diferencias en parámetros de calidad del tubérculo como el contenido en materia seca, ceniza y aminoácidos esenciales. Estos hallazgos sugieren que la diversidad de las isoformas de patatina puede ser un marcador útil en la autenticación y trazabilidad de las variedades de patata, así como en la selección de variedades para los programas de mejora genética del cultivo. Finalmente, el análisis de los perfiles del proteoma global en tubérculos endodormantes de patata de tres variedades con diferente longitud del periodo de dormancia (corta, media y media-larga) mostró cambios estadísticamente significativos en la abundancia de proteínas entre cultivares. Se identificaron un total de 8 proteínas no redundantes (11 proteínas/isoformas) diferencialmente representadas entre cultivares con funciones diversas, generalmente relacionadas con el desarrollo y la brotación del tubérculo. Por tanto, estas proteínas identificadas podrían ser proteínas candidatas implicadas en las variaciones en el periodo de la longitud de la dormancia. Este estudio inicia el camino de la búsqueda del subproteoma total implicado en las variaciones de la longitud de la dormancia que contribuirá indudablemente a dilucidar las claves biológicas de un carácter de gran importancia en la industria de la patata.

Palabras Clave: *Solanum tuberosum*; proteoma de patata; proteínas de reserva; patatina; semilla seca y vegetativa; caracteres de calidad del tubérculo; longitud de la dormancia; electroforesis bidimensional; espectrometría de masas

ABSTRACT

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important crops for human consumption that provides much higher yields than the rest of the crops with the highest production. The amount of protein in the potato tuber is relatively low compared to that of other crops, but of very high nutritional quality, comparable to that of the egg model protein. Within its proteome, storage proteins play a key role both in the reproduction and development of the plant and in the nutritional quality of the total protein of the potato tuber. The main storage protein is patatin since it represents almost half of the total soluble protein. Previous potato proteomic studies have mainly focused on the analysis of storage proteins during tuber development and sprouting. However, studies oriented to the global potato proteome are still very few at present. The main objectives of this work are the bibliographic evaluation of the advances in the biology of the dry and vegetative seed storage proteins achieved through the application of two-dimensional (2-DE) electrophoresis coupled to mass spectrometry (MS) and its impact on crop improvement; the study of the two-dimensional electrophoretic profiles of the multiple isoforms of patatin as possible markers of potato varieties and quality traits; and analysis of global proteome changes associated with tuber dormancy length based on 2-DE and LC-Triple-TOF / MS proteomic technologies. The results of the review study revealed that 2-DE has played a key role in the advances produced in the knowledge of the biology of storage proteins and various areas of application, such as the molecular characterization of its multiple isoforms and post-translational modifications, the differential role of isoforms during seed development and germination and its effects on protein quality and longevity of seeds. On the other hand, the analysis of the diversity of the isoforms of patatin in a total of 15 commercial varieties of potato by 2-DE, showed that the two-dimensional profiles of patatin are unique for each of the varieties

studied and the proteomic distances between varieties have a statistically significant relationship with the differences in tuber quality traits such as the content of dry matter, ash and essential amino acids. These findings suggest that the diversity of the patatin isoforms may be a useful marker in the authentication and traceability of potato varieties, as well as in the selection of varieties for crop breeding programs. Finally, the analysis of global proteome profiles in endodormancy potato tubers of three varieties with different dormancy period length (short, medium and medium-long) showed statistically significant changes in protein abundance among cultivars. A total of 8 non-redundant proteins (11 proteins / isoforms) were identified differentially represented among cultivars with diverse functions, generally related to tuber development and sprouting. Therefore, these identified proteins could be candidate proteins involved in variations in dormancy length period. This study begins the search for the total subproteome involved in the variations in dormancy length, which will undoubtedly contribute to elucidate the biological keys of a character of great importance in the potato industry.

Key Words: *Solanum tuberosum*; potato proteome; storage proteins; patatin; dry and vegetative seed; tuber quality traits; dormancy length; two-dimensional electrophoresis; mass spectrometry

RESUMO

A pataca (*Solanum tuberosum* L.) é un dos cultivos máis importantes para o consumo humano que proporciona rendementos moito máis altos co resto de cultivos con maior produción. A cantidade de proteínas no tubérculo da pataca é relativamente baixa en comparación coa doutros cultivos, pero de alta calidade nutritiva, comparable á da proteína modelo de ovo. Dentro do seu proteoma, as proteínas de reserva xogan un papel clave tanto na reprodución e desenvolvemento da planta como na calidade nutricional da proteína total do tubérculo da pataca. A principal proteína de reserva é a patatina, xa que representa case a metade da proteína soluble total. Estudos anteriores sobre proteómica da pataca centráronse principalmente na análise de proteínas de reserva durante o desenvolvemento do tubérculo e o brote. Non obstante, os estudos orientados ao proteoma global da pataca aínda son moi poucos na actualidade. Os principais obxectivos deste traballo son a avaliación bibliográfica dos avances na bioloxía das proteínas de reserva de sementes secas e vexetativas acadadas mediante a aplicación de electroforese bidimensional (2-DE) acoplada á espectrometría de masas (MS) e o seu impacto na mellora dos cultivos; o estudo dos perfís electroforéticos bidimensionais das múltiples isoformas de patatina como posibles marcadores de variedades de pataca e de parámetros de calidade; e análise dos cambios globais do proteoma asociados coa duración da dormancia do tubérculo baseada en tecnoloxías proteómicas 2-DE e LC-Triple-TOF / MS. Os resultados do estudo de revisión revelaron que a 2-DE xogou un papel clave nos avances producidos no coñecemento da bioloxía das proteínas de reserva e varias áreas de aplicación, como a caracterización molecular das súas múltiples isoformas e modificacións post-traduccionais, o papel diferencial das isoformas durante o desenvolvemento e xerminación das sementes e os seus efectos sobre a calidade das

proteínas e a lonxevidade das sementes. Por outra banda, a análise da diversidade das isoformas da patatina nun total de 15 variedades comerciais de pataca mediante 2-DE, mostrou que os perfís bidimensionais da patatina son únicos para cada unha das variedades estudadas e que as distancias proteómicas entre variedades teñen unha relación estatisticamente significativa coas diferenzas nos parámetros de calidade do tubérculo, como o contido en materia seca, cinzas e aminoácidos esenciais. Estes resultados suxiren que a diversidade das isoformas de patatina pode ser un marcador útil na autenticación e trazabilidade das variedades de pataca, así como na selección de variedades para os programas de mellora xenética do cultivo. Finalmente, a análise dos perfís globais do proteoma en tubérculos endodormantes de pataca de tres variedades con diferentes duracións do período de dormancia (curto, medio e medio-longo) mostrou cambios estatisticamente significativos na abundancia de proteínas entre cultivares. Identificáronse un total de 8 proteínas non redundantes (11 proteínas / isoformas) diferencialmente representadas entre os cultivares con funcións diversas, xeralmente relacionados co desenvolvemento e o brote do tubérculo. Polo tanto, estas proteínas identificadas poderían ser proteínas candidatas implicadas en variacións no período de duración da dormancia. Este estudo comeza a busca do subproteoma total implicado nas variacións da duración da dormancia, o que sen dúbida contribuirá a dilucidar as claves biolóxicas dun carácter de gran importancia na industria da pataca.

Palabras chave: *Solanum tuberosum*; proteoma de pataca; proteínas de reserva; patatina; semente seca e vexetativa; caracteres de calidade do tubérculo; duración da dormancia; electroforese bidimensional; espectrometría de masas

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL CULTIVO	3
1.2	PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DEL CULTIVO	3
1.3	VALOR NUTRICIONAL.....	6
1.3.1	Procesado térmico	8
1.3.2	Caracteres de calidad.....	9
1.4	CICLO BIOLÓGICO	10
1.4.1	Dormancia.....	12
1.5	PROTEÓMICA	15
1.5.1	Proteoma de semilla seca y vegetativa.....	17
1.5.2	Proteoma de la patata	19
1.5.2.1	Inhibidores de proteasas.....	20
1.5.2.2	Patatina	21
1.5.3	Biomarcadores proteómicos.....	23
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1	METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.....	33
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	34
3.3	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PROTEICA	36
3.4	ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL	37
3.5	ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS)	38
3.6	CONTENIDO DE CENIZA, MATERIA SECA, AZÚCARES REDUCTORES Y ALMIDÓN	40
3.7	CONTENIDO PROTEICO Y COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA.....	41
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1	CAPÍTULO PRIMERO: EVALUACIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS AVANCES EN LA BIOLOGÍA DE LAS SSPs Y VSPs BASADOS EN LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	47
4.1.1	Terminología y clasificación de proteínas de reserva	47

4.1.2	Mapas bidimensionales de las proteínas de reserva	51
4.1.3	Avances en la biología de las proteínas de reserva.....	57
4.1.3.1	Desarrollo de las semillas	58
4.1.3.2	Germinación de las semillas	61
4.1.4	Áreas de aplicación en el cultivo de las semillas	64
4.1.4.1	Calidad de las semillas.....	64
4.1.4.2	Longevidad de las semillas	66
4.1.4.3	Otras aplicaciones	67
4.1.5	Conclusiones generales y perspectivas	68
4.2	CAPÍTULO SEGUNDO: ASOCIACIÓN DE DISTANCIAS PROTEÓMICAS BASADAS EN LA PATATINA CON PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PATATA.....	69
4.2.1	Perfiles de 2-DE de la patatina en cultivos de patata.....	69
4.2.2	Distancia proteómica entre cultivares	71
4.2.3	Contenido de nutrientes de los cultivares	73
4.2.4	Asociación entre las distancias proteómicas y parámetros de calidad del tubérculo.....	79
4.3	CAPÍTULO TERCERO: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS INVOLUCRADAS EN LA DURACIÓN DE LA DORMANCIA DEL TUBÉRCULO DE PATATA	85
4.3.1	Desarrollo del tubérculo	85
4.3.2	Proteomas diferenciales en la dormancia.....	86
4.3.3	Identificación de proteínas	89
4.3.4	Proteínas candidatas en la duración de la etapa de dormancia ..	95
4.3.5	Interruptor de liberación de la dormancia	100
5	CONCLUSIONES.....	105
6	BIBLIOGRAFÍA	111
7	ANEXOS	157



INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 ORIGEN Y DOMESTICACIÓN DEL CULTIVO

La patata (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo originario de Sudamérica utilizado para la alimentación humana desde el año 8000 a. C. y cuya domesticación data de la época precolombina (Camire *et al.*, 2009). Esta planta herbácea pertenece a la familia *Solanaceae* junto a otras 3.000 – 4.000 especies, entre las que se encuentra el tomate (*S. lycopersicum* L.) o la berenjena (*S. melongena* L.) (Machida-Hirano, 2015). Las diferentes especies del cultivo de la patata han sido clasificadas por el ICBN (*International Code of Botanical Nomenclature*) y el ICNCP (*International Code of Nomenclature of Cultivated Plants*). Sin embargo, existe gran controversia a la hora de clasificar las diferentes especies, subespecies y variedades del cultivo (Huaman and Spooner, 2002). Aún no se ha podido desvelar de manera concluyente el origen evolutivo concreto, impidiendo el consenso a la hora de determinar el número de especies y variedades (Navarre and Pavek, 2014; Spooner *et al.*, 2014). Actualmente se estima que el cultivo de la patata abarca más de 4.000 variedades nativas. En el CIP (*International Potato Center*) se recoge la mayor colección de variedades: más de 7.000 variedades entre nativas, silvestres y mejoradas (CIP, 2020).

1.2 PRODUCCIÓN Y RENDIMIENTO DEL CULTIVO

La planta de la patata puede crecer en una gran variedad de ambientes, y producirse en la gran mayoría de los continentes debido a su gran diversidad (Navarre and Pavek, 2014). Los datos sobre

producción y rendimiento del cultivo aparecen englobados en la base de datos FAOSTAT (2019). En el año 2017, la producción global de tubérculo de patata fue aproximadamente de 388,2 millones de toneladas. Es por tanto el cuarto cultivo más importante para la alimentación humana, por detrás del maíz (*Zea mays* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.) (Figura 1). Sin embargo, cabe destacar que la superficie utilizada para alcanzar esta producción apenas llega a 19 millones de hectáreas. Una superficie muy por debajo de las 197, 218 y 167 millones de hectáreas que ocupan los cultivos del maíz, trigo y arroz, respectivamente. Esto deja constancia de la gran eficiencia que alcanza el cultivo de la patata, con un rendimiento aproximado de 20 toneladas por hectárea (Figura 2) (FAOSTAT, 2019).

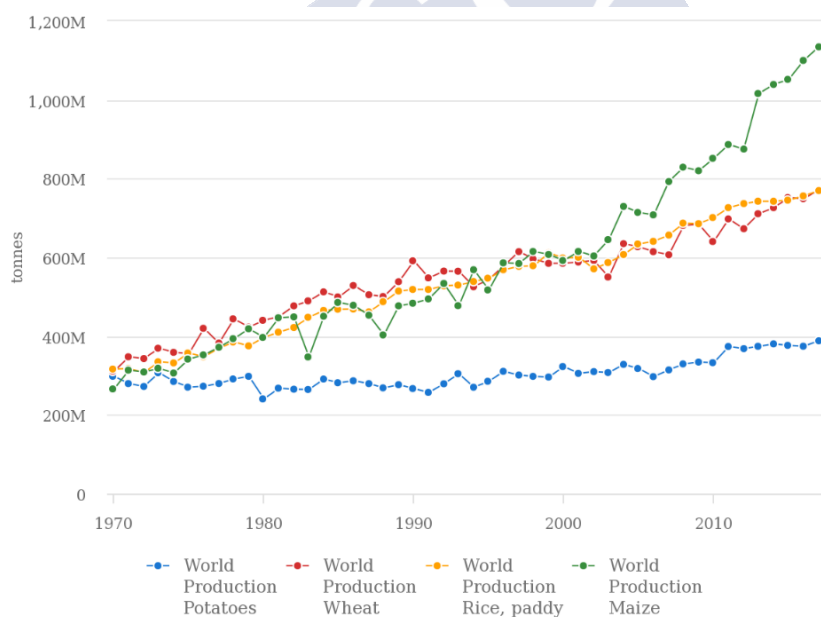


Figura 1. Valores históricos desde 1970 hasta 2017 de la producción global en toneladas de los cuatro cultivos más importantes para la alimentación de la población humana (FAOSTAT, 2019).

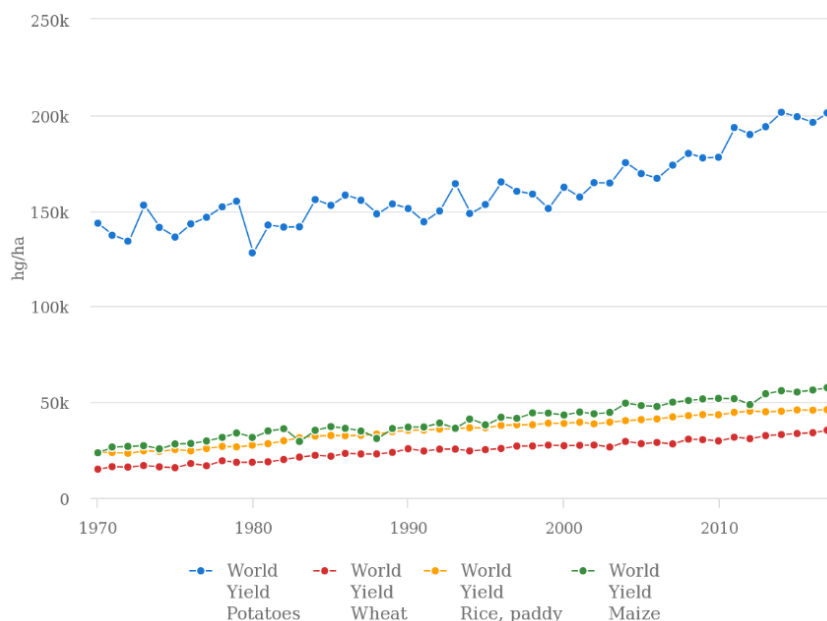


Figura 2. Valores históricos desde 1970 hasta 2017 del rendimiento por hectárea cultivada de los cuatro cultivos más importantes para la alimentación de la población humana (FAOSTAT, 2019).

La producción global de tubérculos de patata no tiene como único destino la industria alimentaria para el consumo humano. Parte de la producción total es utilizada por la industria de la alimentación animal, industria del almidón o la producción de alcoholes. Además, en estas industrias se generan diferentes subproductos, como es el caso de la piel y de la pulpa en la industria alimentaria y almidonera, respectivamente. Estos materiales sobrantes son aprovechados para nuevos propósitos (Bauw *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012; Ncobela *et al.*, 2017). Entre ellos, cabe destacar: la alimentación animal, la extracción de antioxidantes o la extracción de componentes bioactivos contra el parásito *Trichomonas vaginalis* (Franco *et al.*, 2016; Ncobela *et al.*, 2017; Friedman *et al.*, 2018). Otros usos de los subproductos de la patata son

la producción de aditivos alimentarios, cosméticos, bioplásticos, espesantes e incluso papel (Rodríguez-Amado *et al.*, 2014; Waglay *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2016; Pfister and Zeeman, 2016; Basiak *et al.*, 2017).

1.3 VALOR NUTRICIONAL

Es importante destacar que al tratarse de uno de los alimentos más consumidos en el mundo, la patata suministra el 60% del aporte calórico de la dieta diaria de la población humana (Lehesranta *et al.*, 2006). Debido a su composición, la patata es un alimento que se caracteriza por su elevado valor nutricional (Waglay *et al.*, 2014; Calliope *et al.*, 2018). El agua es el componente principal del tubérculo, al estar representada en una proporción aproximada de 79,3 g/100 g de peso fresco. Los carbohidratos son el segundo componente de mayor proporción en el tubérculo, con una media de 17,5 g /100 g (Tabla 1). La principal fuente de carbohidratos es el almidón, el cual representa aproximadamente el 15,3% del peso total del tubérculo, proporcionando una energía de 77 kcal / 100 g (USDA, 2019). Cabe destacar que estos valores nutricionales pueden variar en función de los diferentes procedimientos de cocinado (Tian *et al.*, 2016).

Tabla 1. Relación del aporte nutricional promedio del tubérculo de patata en 100 g de peso fresco (USDA, 2019).

Componente	Cantidad
Agua	79,25 g
Carbohidratos	17,49 g
Almidón	15,29 g
Proteína	2,05 g
Fibra	2,1 g
Ceniza	1,11 g
Azúcares	0,82 g
Lípidos	0,09 g
Energía	77 kcal

Asimismo, el tubérculo de la patata también presenta otras cualidades añadidas. Entre las que se encuentra la actividad antioxidante, gracias a componentes fitoquímicos como es el caso de antocianinas y carotenoides. Estos fitoquímicos juegan un papel importante en la prevención de cánceres y aterosclerosis (Tian *et al.*, 2016). Además, la patata está considerada una fuente de vitamina C. Aunque su cantidad disminuye tras el procesado térmico industrial (Wang and Xiong, 2005; Burlingame *et al.*, 2009; Camire *et al.*, 2009; Rodríguez-Amado *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2016).

La fracción proteica del tubérculo de patata es reducida pero de gran valor nutricional. En particular, la cantidad de proteína está comprendida en un rango que oscila entre 1,93 y 4,85 g / 100 g (Bártová *et al.*, 2015; Calliope *et al.*, 2018). Sin embargo, su valor nutricional supera al de las proteínas de muchas plantas y cereales. Incluso, se equipara con la proteína del huevo, una proteína modelo de referencia para estimar la calidad nutricional proteica (Ralet and Guéguen, 2000). La calidad proteica de la proteína de la patata se debe a su composición aminoacídica. Las proteínas de la patata poseen una alta concentración del aminoácido lisina, además de una proporción importante de los aminoácidos metionina y cisteína (Kamnerdpetch *et al.*, 2007; He and Yang, 2013). Estos dos últimos aminoácidos azufrados requieren de una síntesis más compleja, y es por esa razón que sus cantidades son escasas en otros vegetales (López-Pedrouso *et al.*, 2014a).

1.3.1 Procesado térmico

El proceso térmico que tiene lugar durante el cocinado modifica en cierta medida el valor nutricional de tubérculo. Este proceso aporta beneficios como la inactivación de microorganismos o el aumento de la digestibilidad del almidón que es muy baja en crudo (Tian *et al.*, 2016). Sin embargo, otras modificaciones afectan negativamente a la calidad nutricional de la patata como, por ejemplo, el aumento de grasa cuando se da una fritura en abundante aceite (Murniece *et al.*, 2011). También puede generar elementos tóxicos como la acrilamida. Un componente potencialmente cancerígeno que se forma a través de la reacción de Maillard, en la que el aminoácido asparagina reacciona con azúcares reductores (Tareke *et al.*, 2002; Camire *et al.*, 2009; Halford *et al.*, 2012; Wiberley-Bradford *et al.*, 2014). Dichos azúcares reductores involucrados en la reacción aumentan significativamente cuando el tubérculo es almacenado por debajo de su temperatura óptima. Este proceso es conocido como *cold-induced sweetening* o *low-temperature*

sweeteiting (Isherwood, 1973; Blenkinsop *et al.*, 2002; Wiberley-Bradford *et al.*, 2014). Esta problemática es especialmente relevante en muchas cosechas que son almacenadas a baja temperatura para poder cubrir la demanda anual. Esto es debido a que sin el almacenamiento en frío la vida media del tubérculo rondaría los 6 meses (Bianchi *et al.*, 2014; Clasen *et al.*, 2015).

1.3.2 Caracteres de calidad

Los principales caracteres de la calidad del cultivo de la patata se pueden evaluar a través del estudio de la composición química. Entre estos caracteres se pueden destacar la cantidad de proteína total, la humedad, el almidón, los azúcares reductores y el contenido en ceniza. En primer lugar, el contenido proteico total es uno de los parámetros de mayor importancia. A pesar de que, como se menciona anteriormente, no se trata de una cantidad muy elevada, la fracción proteica es muy rica en aminoácidos esenciales (Waglay *et al.*, 2014). A lo largo de la literatura se han utilizado diferentes índices para medir la calidad proteica, entre los que se puede destacar el índice PDCAAS (*Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score*) y el EAAI (*Essential Amino Acid Index*). El PDCAAS hace referencia a la proporción de la cantidad del primer aminoácidos limitante de la proteína para la dieta patrón de un/a niño/a en edad preescolar (López-Pedrouso *et al.*, 2019). Sin embargo, Oser (1951) propuso el EAAI, basado en la media geométrica de los aminoácidos esenciales respecto a la proteína modelo del huevo (Olu and Adediran, 2015). Por otro lado, el porcentaje de humedad del tubérculo es especialmente relevante cuando los tubérculos son destinados para cocinado en frito. Cuando se sumerge la patata en aceite se provoca una vaporización del agua, facilitando una mayor absorción de grasa. Como consecuencia, se ha encontrado la existencia de una correlación entre la humedad y el contenido energético del tubérculo de patata (Murniece *et al.*, 2011).

Por otra parte, el almidón y los azúcares reductores son dos parámetros estrechamente relacionados entre sí. El almidón es osmóticamente inerte y constituye la principal fuente de carbohidratos (Pfister and Zeeman, 2016). Su composición de polímeros de α -glucosa lo convierte en una sustancia insoluble. Dentro de la industria de la patata, el almidón está considerado un valioso componente debido a las diferentes funciones que puede desempeñar: como aglutinante, gelificante o espesante (Pfister and Zeeman, 2016). El almacenamiento en frío utilizado para cubrir la demanda anual provoca la generación de azúcares reductores a partir del almidón. Estos azúcares reductores reaccionarán con aminoácidos libres dando lugar a la denominada reacción de Maillard. Esta reacción se desencadena por el calor, formando acrilamida entre otros productos (Blenkinsop *et al.*, 2002; Tareke *et al.*, 2002).

Por último, el contenido en ceniza es el parámetro de calidad del que se infiere el contenido de elementos inorgánicos. Tras someter la muestra a una calcinación que elimina toda la materia orgánica, se obtiene el residuo de elementos inorgánicos que tienen que combinarse en una forma estable (Pomeranz and Meloan, 1994).

1.4 CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico de la patata se puede dividir en cinco fases: dormancia, brotación, expansión de brotes, floración y tuberización (Figura 3). La tuberización consiste en el fenómeno de formación del tubérculo a través de un estolón. Es el proceso más sensible del desarrollo del tubérculo, siendo así un factor que limita la distribución geográfica del cultivo al estar relacionado con el clima (Dutt *et al.*, 2017). El estolón experimenta un desarrollo en extensión, completándose posteriormente con un crecimiento radial que dota al

tubérculo de su morfología ovalada característica (Vreugdenhil and Struik, 1989; Jefferies and Lawson, 1991; Dutt *et al.*, 2017). Una vez que el tubérculo está formado pasa por una serie de estados de dormancia que han sido estudiados en profundidad debido a su importancia económica.

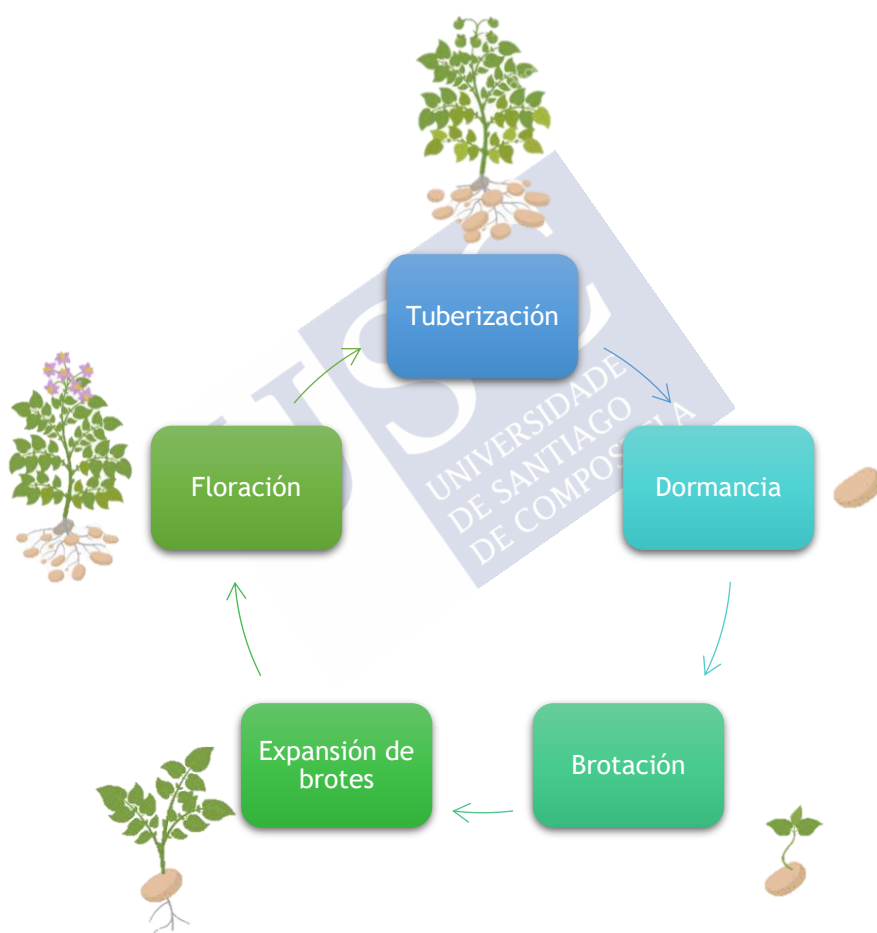


Figura 3. Diagrama esquemático del ciclo biológico de *S. tuberosum*.

1.4.1 Dormancia

La dormancia es uno de los estadios más importantes en el desarrollo del tubérculo. Los diferentes estadios de la dormancia y su relación con la temperatura han sido previamente estudiados (Suttle, 2007; Viola *et al.*, 2007; Teper-Bamnolker *et al.*, 2012; Aksenova *et al.*, 2013; Sonnewald and Sonnewald, 2014; Bisognin *et al.*, 2018). Se pueden distinguir tres tipos de dormancia en función de la edad fisiológica del tubérculo y de la temperatura del ambiente que pueden llegar a solaparse: endodormancia, paradormancia y ecodormancia. En primer lugar, justo después de la cosecha, el tubérculo se encuentra en endodormancia. La característica principal de este estado es que los meristemos, a través de los cuales se formará el brote, se encuentran inhibidos por el propio tubérculo. Por tanto, mientras el tubérculo se encuentre en esta fase, tiene imposibilitada la germinación del meristemo. A continuación, cuando se está liberando la endodormancia comienza la paradormancia o la ecodormancia, dependiendo de los factores externos en los que se encuentre. Con temperaturas superiores a 5 °C, el tubérculo entra en el estado de paradormancia, en el cual los meristemos siguen inhibidos a excepción del meristemo apical. Es lo que se conoce como la inhibición colateral. De esta forma el tubérculo da lugar al *bud break*, término con el que se conoce la salida del brote apical que posee una altura de 2 mm aproximadamente. Una vez que se libera la paradormancia, van apareciendo nuevos brotes laterales y el tubérculo se encamina al desarrollo de la plántula. Sin embargo, el tubérculo entrará en el estado de ecodormancia a temperaturas inferiores a 3 °C. En la ecodormancia los meristemos se encuentran inhibidos por factores externos, como es el caso de la temperatura, imposibilitando la germinación de la plántula (Figura 4).

La duración de la dormancia es una característica de gran valor para la industria de la patata. Por un lado, el inicio de la germinación no es

deseada por los consumidores e impide cubrir la demanda anual. Además, la germinación dificulta el paso del aire entre los tubérculos almacenados, favoreciendo aumentos de temperatura que desencadenan la aparición de patógenos (Suttle *et al.*, 2016). Mientras que, por otro lado, los agricultores están interesados en el acortamiento de este periodo dormante, ya que posibilita una instalación más frecuente del cultivo (Bajji *et al.*, 2007a).

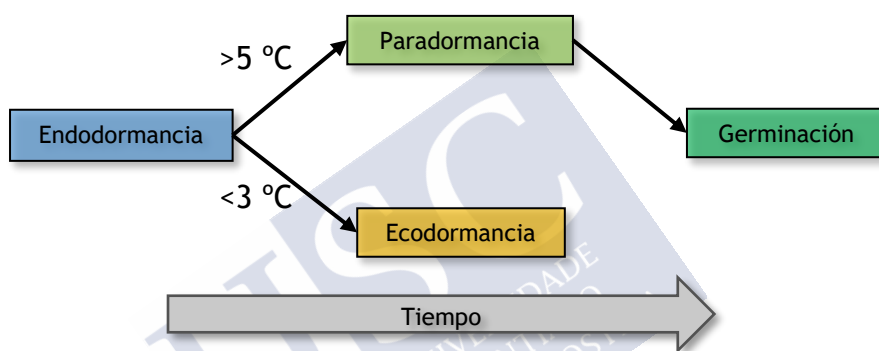


Figura 4. Progresión esquemática de los estadios de la dormancia del tubérculo de patata a lo largo de su almacenamiento.

La duración de la dormancia es muy variable en las variedades del cultivo, ya que se han caracterizado periodos de dormancia desde 15 hasta 197 días (Bogucki and Nelson, 1980; Fauconnier *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016). Sin embargo, no se conoce en profundidad cuál es el mecanismo molecular que afecta a esta duración diferencial de la dormancia (Destefano-Beltran *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Actualmente se recurre al almacenamiento en frío o a la utilización de fitoquímicos para retrasar la germinación. Algunos de los fitoquímicos más utilizados son el clorpropham (CIPC), hidrazida maleica y dimetilnaftaleno (Aksenova *et al.*, 2013; Foukaraki *et al.*, 2016). Por otra parte, también se utilizan otros fitoquímicos como el bromoetano,

Rindite o GA3 para acortar la dormancia y provocar una rápida aceleración de la germinación (Alexopoulos *et al.*, 2007, 2009; Eshel, 2015). Desafortunadamente, estas prácticas no son inocuas para el producto, ya que afectan a la calidad del alimento. El almacenamiento a bajas temperaturas desemboca en el proceso de *cold-induced sweetening* que dará lugar a través de la reacción de Maillard a la aparición de acrilamida. Este proceso, además de su actividad cancerígena, dota al producto de una pigmentación marrón que es rechazada por el consumidor (Hou *et al.*, 2017). Por otra parte, los fitoquímicos también acarrearán aspectos negativos para el cultivo. En el caso del CIPC, uno de los productos más utilizados en la industria, provoca daños en los ojos del tubérculo, causados por la inhibición de la mitosis de los meristemas (Campbell *et al.*, 2010; Cools *et al.*, 2014). También se ha desaconsejado el uso del bromoetano y Rindite debido a su alta toxicidad (Campbell, 2015). A todos estos aspectos negativos se le suman nuevas legislaciones y presiones por parte de los consumidores, que buscan una reducción en el uso de pesticidas. De esta forma se fomenta la sustitución de estas prácticas con nuevas tecnologías alternativas con el fin de solucionar dicha problemática tales como el uso de aceites esenciales o monoterpenos (Cools *et al.*, 2014).

La duración de la dormancia está condicionada por el genoma y el ambiente durante el crecimiento y el almacenamiento (Burton, 1989; Destefano-Beltran *et al.*, 2006). Sin embargo, muchos estudios sugieren que a pesar de que muchos factores afectan a la duración de la dormancia, ésta depende principalmente del genotipo (Viola *et al.*, 2007; Aksenova *et al.*, 2013; Eshel, 2015). Concretamente, Simmonds (1964) concluyó que la duración de la dormancia dependía en gran medida de un sistema genético poligénico. Posteriormente, a través del estudio de loci de caracteres cuantitativos (QTL) en diferentes poblaciones de patatas, Freyre *et al.* (1994) y van den Berg *et al.* (1996)

consiguieron determinar que la duración de la dormancia se regía por un control genético directo. Sin embargo, estos QTL no consiguieron revelar los genes específicos que estaban involucrados (Suttle *et al.*, 2016).

1.5 PROTEÓMICA

Las variedades de *S. tuberosum* exhiben una gran diversidad de ploidías, cuyo rango abarca desde diploides ($2n = 2x = 24$) hasta hexaploides ($2n = 6x = 72$). No obstante, las variedades cultivadas son generalmente tetraploides ($2n = 4x = 48$). El tamaño del genoma, revelado por el proyecto de secuenciación del genoma de la patata es de 844 Mb estructuradas en 12 cromosomas (Berdugo-Cely *et al.*, 2017). El genoma de la patata contiene 39.031 genes codificadores de proteínas y un gran número de genes deletéreos en heterocigosis. Esto es debido a la depresión por consanguinidad a la que el cultivo está sometido (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). Las variedades comerciales utilizan la multiplicación vegetativa como medio para su propagación. Esta práctica ha provocado en muchas ocasiones una degeneración de los órganos florales reproductivos. Al tratarse de un cultivo propagado casi en exclusiva de manera clonal, provocan que al cruzarse entre sí se originen los efectos de depresión por endogamia (Zhang *et al.*, 2019). Se ha llegado a predecir unas 344.831 sustituciones deletéreas. A través de las mutaciones deletéreas Zhang *et al.* (2019) sugirieron que el cruce de líneas consanguíneas pertenecientes a linajes diferentes tendría un alto grado de heterosis. Por contrapartida, las variedades silvestres son comúnmente diploides. Estas variedades son cruzadas con tetraploides para inducir una mejora de las cualidades nutricionales y un aumento de la resistencia a pestes y enfermedades (Watanabe, 2015).

La proteómica es la rama científica encargada del estudio del proteoma. El término "proteoma" fue acuñado por Wilkins *et al.* (1996) para designar al conjunto de proteínas expresadas por el genoma de un organismo, tejido o célula en un momento dado. El proteoma es muy dinámico y es el resultado de la expresión del genoma funcional en un momento concreto y bajo determinadas condiciones ambientales (Wilkins *et al.*, 1996). La proteómica permite el estudio de las proteínas y sus isoformas, su estructura, redes de interacción y modificaciones postraduccionales (Blackstock and Weir, 1999; Tyers and Mann, 2003). Su aplicación ha contribuido a un conocimiento más profundo de la biología de las plantas y la mejora de los cultivos (Jorrín *et al.*, 2007; Miernyk and Hajdich, 2011; Pechanova and Pechan, 2017; Wu *et al.*, 2017). Los estudios proteómicos realizados sobre tejidos u órganos vegetales no solo han podido estudiar los cambios producidos por diferentes estímulos ambientales, sino que también permiten la comparación de líneas genéticamente distantes (Cánovas *et al.*, 2004). La proteómica dispone actualmente de un amplio abanico de metodologías para la caracterización precisa de los proteomas. La electroforesis bidimensional (2-DE) acoplada a la espectrometría de masas (MS) y el uso de técnicas *gel-free* o *shotgun proteomics*, constituyen las dos estrategias metodológicas principales para abordar el estudio de los proteomas. Ambas estrategias exhiben fortalezas y debilidades y su uso depende de los objetivos del estudio (Görg *et al.*, 2009; Rabilloud and Lelong, 2011; Silva-Sanchez *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016; Juan, 2019). Estudios recientes muestran que los dos tipos de estrategias permiten abordar la caracterización de subproteomas distintos. Estudios realizados en el arroz (*O. sativa*) observaron que ambas metodologías son complementarias, permitiendo una mayor cobertura del proteoma global (Tan *et al.*, 2007; Mouzo *et al.*, 2018a).

La 2-DE es una metodología ampliamente utilizada desde que fue introducida inicialmente por O'Farrell (1975) para la separación

eficiente de mezclas complejas de proteínas (Blackstock and Weir, 1999; Zhang *et al.*, 2014). Se basa en la separación de las proteínas en una primera dimensión en función del punto isoeléctrico (pI) a través de un isoelectroenfoque (IEF). En la segunda dimensión, las proteínas se separan en función de su masa molecular (M_r) mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) (Weiss and Görg, 2007; Rabilloud and Lelong, 2011). Avances técnicos recientes han permitido incrementar significativamente el nivel de resolución de la 2-DE. La utilización de tiras de gradientes de pH inmovilizados (IPGs) han hecho posible corregir los errores de reproducibilidad y resolución de los anfolitos de uso previo (Görg *et al.*, 2008, 2009). Las tiras IPG de rango estrecho de pH también permiten la obtención de perfiles proteicos bidimensionales (*zoom gels*) con un mayor grado de detalle en un rango dado de pI. La introducción de tintes fluorescentes de mayor sensibilidad que tinciones previas, con un mayor rango dinámico y compatibles con la posterior identificación proteica mediante las técnicas de MS ha sido otro de los avances técnicos de relevancia, especialmente para la cuantificación proteica (Chevalier, 2010; Rabilloud and Lelong, 2011; Mehta-D'souza, 2012). La 2-DE acoplada a MS ha sido eficaz para el avance en el estudio de las semillas secas y vegetativas en diversos aspectos como el contenido en gluten (García-Molina *et al.*, 2017; Kawaura *et al.*, 2018), identificación de alérgenos (Palomares *et al.*, 2005) o la producción de proteínas terapéuticas (Kim *et al.*, 2008).

1.5.1 Proteoma de semilla seca y vegetativa

El estudio de los proteomas vegetales y su calidad nutricional tiene una especial relevancia ya que proporcionan aproximadamente el 58% de la ingesta proteica de la dieta mundial (Pasiakos *et al.*, 2015; van Vliet *et al.*, 2015). Concretamente, son las semillas las que aportan el mayor porcentaje de contenido proteico. El rango de su contenido

proteico oscila desde el 10% de peso seco en cereales hasta el 40% en leguminosas y oleaginosas (Shewry *et al.*, 1995). Las proteínas de almacenamiento o de reserva constituyen la fracción proteica más importante, tanto para la nutrición humana como para su propia reproducción. Las proteínas de reserva poseen un peso molecular de 10 a 130 kDa, y se encuentran tanto en semillas secas (SSP) como el caso de *Phaseolus vulgaris* L. o tejidos vegetativos (VSP) como el caso de *S. tuberosum* (Mouzo *et al.*, 2018a). Las SSPs y VSPs son proteínas abundantes aunque los subtipos se encuentran representados diferencialmente en los proteomas de semillas/tubérculos con cantidades relativas que abarcan desde el 1-4% en el caso de las zeínas β y δ del trigo (*T. aestivum*) hasta el 80% en el caso del las convicilinas de la lenteja (*Lens culinaris* Medik.) (Lund *et al.*, 1995; Scippa *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2013). Por tanto, las proteínas de reserva son las que determinarán en gran medida la calidad nutricional de la proteína de semilla al ser la fracción mayoritaria.

Las proteínas de reserva engloban una colección heterogénea de proteínas diferenciadas funcionalmente. Estas proteínas experimentan cambios tanto cualitativos como cuantitativos altamente dinámicos durante el desarrollo y la germinación de las semillas. Las proteínas de reserva engloban típicamente un número variable de isoformas codificadas por familias de genes con un elevado grado de homología agrupados en uno o varios cromosomas (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011; Kim *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2017; Gacek *et al.*, 2018). La 2-DE es especialmente útil para el estudio de las proteínas de reserva altamente representadas en los proteomas de las semillas secas y vegetativas. Perfiles bidimensionales de alta resolución en conjunción con la espectrometría de masas han permitido avanzar significativamente en la caracterización de las múltiples isoformas de las SSPs y VSPs y sus implicaciones biológicas (Bárta *et al.*, 2012; de

la Fuente *et al.*, 2012; López-Pedrouso *et al.*, 2014a, b; Bernal *et al.*, 2017; Mouzo *et al.*, 2018b).

1.5.2 Proteoma de la patata

Los estudios proteómicos en el cultivo de la patata han sido hasta la fecha menos numerosos en comparación a los realizados en otros cultivos de gran producción mundial. Solo unos pocos estudios se han orientado a la caracterización del proteoma global del tubérculo de la patata tales como el estudio del desarrollo de la tuberización en función del proteoma (Agrawal *et al.*, 2008), la variación natural del proteoma en relación con las magulladuras (Urbany *et al.*, 2011), el análisis del proteoma en respuesta al estrés osmótico (Bündig *et al.*, 2016) o la comparación proteómica de la regulación por auxinas en la tuberización (Wang *et al.* 2018). El proteoma del tubérculo de patata engloba una gran variedad de proteínas. Yu *et al.* (2012) identificó a través de análisis de LC-MS/MS hasta 251 proteínas diferentes en el estado de tuberización de tubérculos desarrollados *in vitro*. Las proteínas del proteoma de la patata se pueden dividir en tres grandes categorías: inhibidoras de proteasas, patatinas y proteínas de gran peso molecular menos caracterizadas (Ralet and Guéguen, 2000). Las VSPs son las proteínas del proteoma de tubérculo de patata más intensivamente estudiadas hasta la fecha (Tabla 2) (Ralet and Guéguen, 2000; Bauw *et al.* 2006; Bárta *et al.* 2012; Bernal *et al.*, 2017; Mouzo *et al.*, 2018a; Bernal *et al.* 2019).

Tabla 2. Listado de las proteínas de reserva del tubérculo de patata (Mouzo *et al.*, 2018a).

VSPs de <i>S. tuberosum</i>	Peso molecular (kDa)
Inhibidores de proteasa 1	45
Inhibidores de proteasa 2	-
Inhibidores de proteasa Kunitz	20
Inhibidores de carboxipeptidasa	10
Lipoxigenasa	97
Patatinas	39-45

1.5.2.1 Inhibidores de proteasas

Las inhibidoras de proteasas son un grupo heterogéneo de proteínas que poseen como principal función la de dificultar la actividad de las serina, cisteína y aspartato proteasas (Pouvreau *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). La representación de estas proteínas en la totalidad de la fracción proteica se encuentra alrededor del 35%, y sus pesos moleculares oscilan entre los 5 y 45 kDa (van Koningsveld *et al.*, 2002; Heibges *et al.*, 2003). Las inhibidoras de proteasas no solo desempeñan la función de proteínas de reserva, sino también la de defensa gracias a su actividad antifúngica y antimicrobiana. Estudios recientes determinaron la reducción del crecimiento de: *Rhizoctonia solani* Kühn, *Phytophthora infestans* Mont., *Botrytis cinérea* Pers. y *Fusarium genus* a través de la actividad de inhibidores de proteasa del tubérculo de patata (Park *et al.*, 2005; Bártoová *et al.*, 2019).

1.5.2.2 Patatina

La patatina, también denominada tuberina, es la principal proteína de reserva del tubérculo. Específicamente es una fosfoglicoproteína cuyo peso molecular oscila entre 39 y 45 kDa y posee un rango de pI desde 4,8 hasta 5,3 (Bárta *et al.*, 2012; Bernal *et al.*, 2017). La patatina representa entre el 40% y el 45% de la proteína total soluble, tratándose así de la principal VSP del tubérculo de patata (Shewry, 2003; Kärenlampi and White, 2016; Waglay and Karboune, 2016; Mouzo *et al.*, 2018b). Ésta se localiza en gran medida en el interior de las vacuolas de los tejidos parenquimáticos (Strætkvern *et al.*, 1999). La patatina engloba un conjunto complejo de isoformas codificadas por una familia génica compuesta por 10 a 18 genes con alto grado de homología, la mayor parte de ellos localizados en el cromosoma 8 (Ganal *et al.*, 1991; The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011; Aminedi and Das, 2014). Dicha familia génica se puede subdividir en dos clases: I y II, en función de la localización de su expresión. Los genes de la clase I se expresan predominantemente en el tubérculo, mientras que los de la clase II lo hacen en la raíz. Las dos clases de genes difieren en 22 nucleótidos ubicados en el extremo 5' UTR que están presentes en la clase I y se encuentran ausentes en la clase II (Pots *et al.*, 1999; Stupar *et al.*, 2006).

La secuencia primaria de la patatina se compone de aproximadamente 363 aminoácidos y sus monómeros se asocian en estructuras diméricas de 88 kDa, como se pudo comprobar a través de electroforesis en condiciones nativas (Pots *et al.*, 1999; Ralet and Guéguen, 2000). La estructura terciaria es estable hasta temperaturas de 45 °C y se caracteriza por poseer un 33% de hélices α y un 45% de láminas β . Cuando la temperatura alcanza valores cercanos a 50° C se produce su despliegue hasta la desnaturalización (Pots *et al.*, 1999).

Las glicosilaciones y fosforilaciones son las principales modificaciones postraduccionales que exhiben las isoformas de patatina. Los perfiles bidimensionales de alta resolución para el estudio de las proteínas de reserva han permitido separar un total de 11 a 23 isoformas de patatina diferenciados tanto en pI como en M_r en diferentes cultivares (Lehesranta *et al.*, 2005; Bauw *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012). Sin embargo, a través de obtención de nuevos perfiles bidimensionales de alta resolución, la caracterización resultante alcanza una mayor precisión (Bárta *et al.*, 2012; de la Fuente *et al.*, 2012; López-Pedrouso *et al.*, 2014a, b; Bernal *et al.*, 2017; Mouzo *et al.*, 2018b). Las glicosilaciones se localizan en tres lugares de la secuencia de la patatina donde se encuentran residuos de asparagina. Concretamente en las asparaginas situadas en las posiciones 60, 90 y 202 (Sonnewald *et al.*, 1989; Bárta *et al.*, 2012). El peso molecular de las isoformas de patatina variará en función del grado de glicosilación en estas posiciones y pueden separarse en la segunda dimensión de los geles bidimensionales de alta resolución (Bernal *et al.*, 2017). Estas glicosilaciones han sido relacionadas con dianas de señalización, ofreciendo así un abanico de actividades como facilitar el plegado proteico o incluso servir como protección frente a la proteólisis (Sonnewald *et al.*, 1989). Estudios recientes también muestran que las isoformas de patatina están fosforiladas en un grado variable (Bernal *et al.*, 2017). El nivel de fosforilación de las isoformas se ha relacionado con los mecanismos de la brotación del tubérculo de patata. Bernal *et al.*, (2019) concluyeron que las isoformas de patatina del tipo kuras, con niveles más altos de fosforilación, se degradaban preferencialmente en la brotación del tubérculo en comparación con las isoformas de patatinas no-kuras con menor nivel de fosforilación. Estas investigaciones sugieren que la patatina es movilizada por un mecanismo dependiente del nivel de fosforilación de sus isoformas.

A diferencia de otras VSPs, la patatina presenta diversas actividades enzimáticas. Una de estas actividades es antioxidante, la cual presenta gracias a los residuos de cisteína y triptófano (Liu *et al.*, 2003; Bárta *et al.*, 2012). Además, cabe destacar que a través de desechos de la industria de la patata como es el caso de la piel se pueden obtener extractos antioxidantes. Estos extractos antioxidantes pueden ser de útil aplicación para otros alimentos como el caso de la oxidación del aceite de soja (Rodríguez-Amado *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2016). Otra de las actividades que posee la patatina es la de aciltransferasa o lípido acil hidrolasa (LAH). Esta última se observó que varía tanto en función del método de extracción como del cultivar (Andrews *et al.*, 1988; Bárta *et al.*, 2012). Por último, también ha sido estudiado la actividad de la patatina como agente emulsionante o espumante para diversos procesos de la industria de la alimentación (Ralet and Guéguen, 2000; Schmidt *et al.*, 2018).

1.5.3 Biomarcadores proteómicos

La gran diversidad de variedades que posee el cultivo de la patata son una gran fuente de variabilidad genética para la mejora del cultivo (Pieterse and Judd, 2014). Se han venido utilizando una gran diversidad de marcadores genéticos para la identificación de QTL para la mejora genética del cultivo de patata: SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSRs (*Inter-Simple Sequence Repeats*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) y SSRs (*Simple sequence repeats*) (Bornet *et al.*, 2002; Spooner *et al.*, 2005; Ghislain *et al.*, 2006; de Galarreta *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Berdugo-Cely *et al.*, 2017). Uno de los primeros trabajos de modificación genética en variedades de patata se llevó a cabo en 1990, donde se consiguió la resistencia al *potato virus X* e *Y* para el cultivar Russet Burbank (Ramadan, 2016). Sin embargo, las herramientas proteómicas permiten estudiar los productos finales de

la expresión de los genes codificadores de proteínas implicados en los caracteres de importancia en el cultivo de la patata y establecer un puente entre el genotipo y el fenotipo. La proteómica comparativa es una vía muy útil, alternativa a la clonación posiciones de QTL, para la identificación de QTL proteicos (pQTL) candidatos implicados en los caracteres biológicos (Acharjee *et al.*, 2018; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2020). Asimismo, posibilita la identificación de biomarcadores específicos de cultivar que pueden utilizarse para la autenticación y trazabilidad en los procesos de producción industrial. Las variaciones del contenido proteico total del tubérculo han sido estudiadas en función de diferentes parámetros que afectan a la calidad de la patata, como es el caso del almidón, cenizas, contenido en materia seca, azúcares o contenido en aminoácidos (Bárta and Bártoová, 2008; Leonel *et al.*, 2017; Acharjee *et al.*, 2018). Sin embargo, los estudios sobre grupos concretos de proteínas del tubérculo de patata como el caso de la patatina en relación con parámetros de calidad son todavía escasos en la literatura (Bárta *et al.*, 2012; Bártoová *et al.*, 2015). Estudios previos en la judía común (*P. vulgaris*) aplicando la 2-DE mostraron que las variaciones de las isoformas de la principal SSP, la phaseolina, entre variedades salvajes y cultivadas guardan relación con sus diferencias en el nivel de calidad de la proteína total en semilla (López-Pedrouso *et al.*, 2014a). Específicamente, con el nivel del aminoácido esencial metionina que es un aminoácido escaso en la judía común. Estas investigaciones sugieren que la faseolina puede ser utilizada como biomarcador para la mejora de la calidad proteica de la semilla de judía. Actualmente, se desconoce si estos resultados en *P. vulgaris* pudieran hacerse extensibles a otras proteínas de reserva de otras especies. Concretamente, no se tiene la información suficiente sobre la variabilidad de las isoformas de patatina en distintos cultivares y su relación con caracteres de calidad del tubérculo. La obtención de esta información permitiría determinar si las isoformas de patatina son un

biomarcador útil del grado de diferenciación genética entre variedades de patata, así como, un biomarcador de parámetros de calidad.







OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

- 2.1 Revisión bibliográfica y evaluación de los avances en el conocimiento de la biología de las proteínas de reserva en semillas secas (SSPs) y vegetativas (VSPs), y sus aplicaciones mediante el uso de la 2-DE acoplada a la espectrometría de masas.
- 2.2 Estimación de las distancias proteómicas entre variedades comerciales de *S. tuberosum* a partir de los perfiles 2-DE de alta resolución de las isoformas de patatina y su posible uso como marcadores de la diferenciación genética interpoblacional.
- 2.3 Análisis de las distancias proteómicas como marcador de las diferencias entre cultivares de patata para caracteres de calidad del tubérculo: ceniza, almidón, contenido proteico, humedad y azúcares reductores.
- 2.4 Estudio de los cambios en el proteoma global del tubérculo de patata asociados con diferencias en la longitud del periodo de dormancia mediante 2-DE y LC/MS.
- 2.5 Identificación de proteínas candidatas y rutas bioquímicas implicadas en la variación de la duración de la dormancia.





MATERIAL Y MÉTODOS



3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Para el estudio de revisión sobre los avances en la biología de las SSPs y VSPs mediante la aplicación de la 2-DE y MS se utilizaron distintos recursos bibliográficos. Se realizó una búsqueda exhaustiva en revistas internacionales, así como en otras publicaciones pertenecientes a editoriales globales especializadas y páginas web indexadas en motores de búsqueda. Entre los motores de búsqueda podemos destacar: PubMed, Google Académico, Scopus o *Web of Science*. Esta búsqueda abarcó gran cantidad de documentos científicos desde la irrupción de la 2-DE sobre las proteínas de reserva en numerosos cultivos y variedades, especialmente en aquéllos de mayor producción.

Por otro lado, la adquisición de la información relativa a las diferentes variedades de patata utilizadas en este estudio se obtuvo principalmente de bases de datos de uso frecuente, entre las que podemos destacar: AHDB (*Agriculture and Horticulture Development Board*) y ECPD (*European Cultivated Potato Database*).

Por último, las búsquedas de información relacionadas con valores históricos de producción del cultivo de la patata y los diferentes valores nutricionales se realizó utilizando los servidores de FAOSTAT (*Food and Agriculture Organization Statistical Database*) y USDA (*United States Department of Agriculture*).

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el estudio de la variación de las isoformas de patatina y su relación con parámetros de calidad del tubérculo, se utilizaron 15 variedades comerciales de *S. tuberosum*: Agria, Amanda, Ambassador, Basin Russet, Desiree, Fina de Carballo, Frisia, Ivory Russet, Kennebec, Kuras, Lady Claire, Lady Rosetta, Montblanc, Musica y Orquesta. Todos estos cultivares utilizados son tetraploides ($2n = 4x = 48$) a excepción de la variedad diploide ($2n = 2x = 24$) Desiree. En la tabla 3, se muestra las especificaciones del pedigrí, origen y utilización comercial preferencial para cada uno de los cultivares utilizados en el estudio. Las variedades utilizadas tienen diferentes usos en la industria de la patata: patatas de mesa, alimentos procesados o producción de almidón (García *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2005; Mouzo *et al.*, 2018b). En su mayoría, los tubérculos de patata utilizados en este estudio fueron suministrados por distribuidores de semillas para agricultores, a excepción de los de las variedades Agria, Fina de Carballo y Kennebec que fueron recolectados de un campo experimental ubicado en Xinzo de Limia (Ourense, España). Todos los tubérculos utilizados se recolectaron en un estadio de dormancia anterior a la germinación del brote apical (Mani *et al.*, 2014). Los tubérculos de cada cultivar se cortaron en rodajas (aproximadamente 10 mm) y se almacenaron por separado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para las posteriores determinaciones proteómicas y químicas. Cada parámetro químico se determinó a partir de dos réplicas biológicas independientes, excepto para la composición aminoacídica que se utilizaron tres réplicas biológicas.

Tabla 3. Características de los cultivares de *S. tuberosum* seleccionados (Mouzo *et al.*, 2018b).

Variedades	Pedigrí	Origen	Uso preferencial
Agria	Quarta × Semlo	Alemania	Mesa y procesados alimenticios
Amanda	Epoka × SV66 123	Suecia	Procesados alimenticios
Ambassador	AR 91-1012 × Innovator	Holanda	Procesados alimenticios
Basin Russet	AR 97-3296 × AR 92-1042	Reino Unido	Mesa y procesados alimenticios
Desiree	Urgenta × Depesche	Holanda	Mesa
Fina de Carballo	No disponible	España	Mesa
Frisia	ZPC 69 C160 × SVP AM 66 42	Holanda	Mesa y procesados alimenticios
Ivory Russet	RZ-93-7105 × Innovator	Reino Unido	Procesados alimenticios
Kennebec	B127 × USDA X96 56	EE. UU.	Procesados alimenticios
Kuras	PG 285 × AR 69 491	Holanda	Procesado de almidón
Lady Claire	Agria × KW 78-34-470	Alemania	Procesados alimenticios
Lady Rosetta	Cardinal × SVP VT n2 62 33 3	Holanda	Mesa y procesados alimenticios
Montblanc	Innovator × BRU93-136	Bélgica	Mesa y procesados alimenticios
Musica	CMK1993-042-005 × Lady Christl	Holanda	Mesa
Orchestra	Maradonna × Cupido	EE. UU.	Mesa

El estudio del proteoma global del tubérculo se realizó en tres variedades comerciales de patata con diferente longitud del periodo de dormancia: Ágata (corta), Kennebec (media) y Agria (media-larga). Los tubérculos de las tres variedades crecieron bajo las mismas condiciones en una finca experimental ubicada en Xinzo de Limia (Ourense, España). Después de la cosecha, cuatro tubérculos de cada una de las tres variedades se liofilizaron y almacenaron a -80 °C para el estudio del proteoma global. Paralelamente, otros 4 tubérculos de cada variedad se transportaron inmediatamente después de la cosecha a una cámara de cultivo con una temperatura de 22/19 °C-luz/oscuridad y un fotoperíodo de 16/8h-luz/oscuridad, para unificar las condiciones de crecimiento y evaluar las duraciones de la dormancia. Los tubérculos se mantuvieron en la cámara hasta el surgimiento del brote apical (*bud break*) de 2 mm, como indicativo de la liberación de la dormancia.

3.3 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN PROTEICA

La extracción de la proteína total de las muestras de tubérculo liofilizadas se llevó a cabo por el método basado en el fenol, siguiendo el procedimiento descrito por López-Pedrouso *et al.* (2014b). Una muestra de 200 mg de patata liofilizada se resuspendió en 3 ml de tampón de extracción (PMSF 1 mM, KCl 100 mM, sacarosa 700 mM, 500 EDTA mM, Tris-HCl 500 mM, DTT al 2%, pH = 8). A continuación, se añadió un volumen igual de fenol saturado en Tris-HCL (pH 6,6 / 7,9), tras una incubación de 10 minutos y la fase orgánica se recuperó mediante centrifugación (4000 g a 4 °C, Labofuge 400 R Heraeus, St Louis). Posteriormente, las proteínas se precipitaron a través de dos soluciones de precipitación: solución I (acetato de amonio 0,1 M en metanol y DTT 10 mM) y II (solución al 80% de acetona y DTT 10 mM). El precipitado se resuspendió en tampón de lisis (tiourea 2 M, DTT 10 mM, CHAPS al 4%, Pharmalyte™ al 2% pH 3–10; GE, Healthcare, Uppsala).

La concentración proteica se midió con un ensayo de Bradford (1976) modificado, utilizando el kit comercial CB-X (GBiosciences, St. Louis, MO) y un lector de microplacas CroMate 4300 (wareness Technology, Palm City, FL). Para la curva de calibrado se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar.

3.4 ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

Se obtuvieron perfiles 2-DE de alta resolución como se ha descrito por Bernal *et al.* (2017). El IEF de la primera dimensión se realizó utilizando tiras IPG (ReadyStrips, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de 24 cm y con un pH lineal de 4–7. En cada tira, se cargó 1 µg del marcador de peso molecular ovoalbúmina (45 kDa, Molecular Probes, Leiden). Además, se cargó la proteína disuelta en tampón de lisis. Para el estudio de las isoformas de patatina se cargaron 75 µg de proteína, mientras que para el estudio de los patrones proteómicos globales fueron 400 µg. Seguidamente, la muestra se disolvió en un tampón de rehidratación compuesto por: 4 % CHAPS, 7 M urea, 2 M tiourea, 0,002% de azul de bromofenol, 0,6% de DTT y 1% de “IPG Buffer” pH 4-7. Las tiras se corrieron usando el dispositivo de electroforesis horizontal programable PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad Laboratories) alcanzando valores de enfoque finales de 70 kVh. Seguidamente, las tiras se lavaron con tampones de equilibrio. Posteriormente, tanto la segunda dimensión para el estudio de la patatina como para el estudio de los patrones proteómicos globales se realizó sobre geles SDS-PAGE desnaturalizantes (10% y 12%, respectivamente). Se utilizó un sistema Ettan DALTsix (GE, Healthcare) manteniendo una corriente y temperatura constantes (25 mA / gel, 25 °C y 20 mA / gel, 25 °C, respectivamente).

A continuación, los geles se lavaron en una solución de fijación (50% agua destilada, 40% etanol, 10% ácido acético) durante 3 horas y se tiñeron con tinción fluorescente SYPRO Ruby (Lonza, Rockland, ME) para la visualización de las proteínas. Las imágenes de los geles 2-DE se digitalizaron con el sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

El análisis de las imágenes se realizó mediante el software PDQuest Advanced v. 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories). Los *spots* fueron detectados y se analizó su repetibilidad manualmente, evitando así el ruido de fondo y errores ocasionados por coincidencia automática. Las tiras de IPG de pH 4–7 lineal se usaron como referencia para evaluar los valores experimentales de pI de cada uno de los *spots*, mientras que los valores correspondientes de M_r se evaluaron a partir de marcadores de peso molecular en el rango de 15 a 200 kDa (Fermentas, Ontario) junto con la ovoalbúmina.

3.5 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS/MS)

Los *spots* proteicos de interés se extrajeron de los geles 2-DE cortando la sección del gel donde se encuentra la porción más intensamente teñida, maximizando la relación proteína-gel y reduciendo el exceso de matriz. Las porciones de gel se sometieron a digestión trípica manual con tripsina siguiendo el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996) con ligeras modificaciones. Las porciones de gel se sometieron a una etapa de reducción proteica con 10 mM de ditioneitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en bicarbonato amónico 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y otra etapa de alquilación con yodoacetamida 55 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) con bicarbonato de amonio 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Posteriormente dichas porciones se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM en metanol al 50% (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, España),

deshidratadas con acetonitrilo (HPLC *grade*, Scharlau, Barcelona, España) y secadas mediante un *SpeedVac*. Una vez secas, a las porciones de gel se les añadió tripsina porcina modificada junto con 20 ng/ μ l de bicarbonato amónico 20 mM. Después de una incubación de 16 horas a 37 °C los péptidos se extrajeron en tres ocasiones a través de incubaciones con 40 μ l de acetonitrilo al 60% en HCOOH al 0,5% durante 20 minutos. Los péptidos se concentraron con un *SpeedVac* y fueron almacenados a -20 °C.

La separación de los péptidos digeridos se llevó a cabo a través de cromatografía de fase inversa, utilizando un sistema micro LC (Eksigent Technologies nanoLC 400, SCIEX) acoplado a MS Triple TOF 6600 de alta velocidad (SCIEX, Foster City, CA). Se utilizó una columna analítica Chrom XP C18 150 \times 0,30 mm (Eksigent, SCIEX), cuyo tamaño de partícula es de 3 μ m y 120 Å de tamaño de poro. Conectada en línea también se utilizó la columna trampa YMC-TRIART C18 (YMC Technologies, Teknokroma), con un tamaño de partícula de 3 μ m y 120 Å de poro. El flujo proporcionado por la microbomba fue de 5 μ l / min, funcionando en condiciones de gradiente. La fase móvil A utilizada fue ácido metanoico al 0,1% en agua y la fase móvil B fue ácido metanoico al 0,1% en acetonitrilo. La separación de los péptidos se llevó a cabo con un gradiente variable de 15 minutos del 2% al 90% de la fase móvil.

La obtención de datos se realizó en un Triple TOF 6600 System (SCIEX, Foster City, CA) operado por el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX, USA) y calibrándose automáticamente cada 4 horas mediante péptidos externos de pepcalMix. El criterio se estableció en iones superiores que la relación masa/carga 350 y menores que 1400, un estado de carga 2-5, y un umbral de más de 200 CPS de abundancia. Los datos fueron procesados mediante ProteinPilotTM 5.0.1 de Sciex, que utiliza como algoritmo de agrupación y búsqueda en bases de datos:

ParagonTM. La base de datos utilizada fue la de *S. tuberosum* en Uniprot. Se aplicó una tasa de falsos positivos (FDR, *False Discovery Rate*) inferior al 1% utilizando un método de ajuste no lineal (Shilov *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008).

3.6 CONTENIDO DE CENIZA, MATERIA SECA, AZÚCARES REDUCTORES Y ALMIDÓN

El porcentaje de la concentración de cenizas se determinó a través de la pérdida de peso como resultado de mantener la muestra en un horno de mufla a 600 °C (Carbolite RWF 1200, Hope Valley). Por otra parte, el porcentaje de materia seca se estimó mediante la pérdida de peso como resultado del secado de la muestra en un horno a 105 °C (Memmert UFP 600, Schwabach). Tanto el contenido de cenizas como el porcentaje de materia seca se cuantificó de acuerdo con los estándares recomendados (ISO 1442: 1997 e ISO 936: 1998, respectivamente).

Los azúcares reductores se extrajeron a través del kit comercial Carrez Clarification (Millipore, Darmstadt) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de este tratamiento, se utilizó 1 ml de la solución para la determinación colorimétrica de azúcares reductores. Dicha solución se mezcló con 1 ml de fenol (5% en agua) y 5 ml de sulfato de hidrazina (38 mM en ácido sulfúrico). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de 490 nm UV-vis (Shimadzu, Kyoto). La concentración de azúcares reductores se determinó usando una curva estándar para D-glucosa.

Por último, para estimar el contenido de almidón se extrajo una muestra de 2 g de cada tubérculo utilizando 25 ml de etanol: éter de petróleo (1:3). Después de centrifugar a 3000 g durante 5 min, el precipitado se lavó tres veces con etanol (80%) a 80 °C y se separó por centrifugación a 3000 g durante 5 min. Posteriormente, el residuo se

incubó con 11,5 ml de ácido perclórico (29,4%) durante 20 minutos seguido de la adición de agua hasta la obtención de una dilución de 1:1000. A continuación, una alícuota de 5 ml se trató con reactivo *anthrone* (200 mg de *anthrone* en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado) y se hirvió durante 8 minutos para desarrollar color. La absorbancia se determinó a 630 nm en un espectrofotómetro UV-vis (Shimadzu, Kyoto) usando una curva de calibración de D-glucosa. Para calcular el contenido de almidón, el valor de glucosa se multiplicó por el factor de conversión de 1,06.

3.7 CONTENIDO PROTEICO Y COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA

El contenido proteico de las diferentes variedades de tubérculos se evaluó mediante el método Kjeldahl basado en el nitrógeno total, utilizando el factor de conversión convencional de 6,25 (ISO 937: 1978). Las muestras se digirieron con ácido sulfúrico (utilizando sulfato cúprico como catalizador) en un digestor (Gerhardt Kjeldatherm KB, Bonn). El nitrógeno orgánico se transformó en sulfato de amonio, que se trató en condiciones básicas en un aparato de destilación (Gerhardt Vapodest 50 Carrousel, Bonn). Tanto la proteólisis como la derivatización de aminoácidos hidrolizados se llevaron a cabo de acuerdo con Franco and Lorenzo (2014). La proteína se hidrolizó a partir de 100 mg de muestra de tubérculo con 5 ml de ácido clorhídrico (6 N) en un sistema sellado durante 24 h a 110 °C. A continuación, la solución se diluyó hasta 200 ml y se tamizó a través de un filtro de 0,45 mm. Las condiciones de derivatización y análisis cromatográfico siguieron las siguientes pautas: 10 µL de muestra tamponada a pH 8,8 (tampón de borato AccQ-Fluor) produciendo un volumen total de 100 µL. La derivatización se produjo mediante la adición de 20 µL de reactivo AccQ-Fluor. El kit de reactivos AccQ-Fluor reaccionó con todas las aminas primarias y secundarias, el reactivo en exceso se hidrolizó. En el caso de la tirosina, la hidrólisis se completó calentando

durante 10 minutos a 55 °C. Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) modelo Alliance 2695 (Waters, Milford) con un detector de fluorescencia (modelo 2475, Waters), con excitación a 250 nm y emisión a 395 nm. El control del sistema y el resultado se llevaron a cabo utilizando el software avanzado Empower 3 (Waters). Se utilizó una columna Waters AccQ-Tag ($3,9 \times 150$ mm) con un tamaño de partícula de 4 μm y con un caudal de $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ a 37 °C. La composición de aminoácidos se expresó en mg / 100 g de peso fresco.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las distancias proteómicas entre pares de cultivares de patata se estimaron mediante el estadístico $D = 1 - F$; donde $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, n_{xy} es el número de *spots* de patatina compartidos en geles 2-DE por los cultivares x e y , y donde n_x y n_y son los números totales de *spots* de patatina identificadas en los cultivares x e y , respectivamente. Los cultivares se agruparon en función del grado de similitud de las distancias proteómicas mediante la construcción de un dendrograma UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*), usando el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

La calidad proteica de las variedades de patata se evaluó mediante PDCAAS y EAAI. El PDCAAS se calculó usando como proteína de referencia el perfil de aminoácidos indispensables, de acuerdo con el patrón de requerimiento aminoácidos para un niño/a de 2 a 5 años. Para la corrección de digestibilidad se utilizaron los valores suministrados para la proteína de patata por el Registro Federal de Estados Unidos, y publicados por la Administración de Alimentos y Medicamentos. Por otro lado, el EAAI se calculó utilizando la composición de aminoácidos de la proteína de huevo como proteína de referencia (FAO/WHO, 1991; FDA/HHS, 1993; Schaafsma, 2005; Olu and Adediran, 2015).

Para los análisis estadísticos se utilizaron el software IBM SPSS (versión 21.0; SPSS, Chicago) y las bibliotecas R. La tasa de falsos positivos en comparaciones múltiples se controló mediante el test estadístico de Benjamini-Yekutieli (Yekutieli and Benjamini, 2001).

Diferencias estadísticas en el volumen medio de los *spots* entre pares de cultivares con diferente periodo de dormancia se determinaron mediante intervalos de confianza bootstrap no paramétrico (Franco *et al.*, 2015a, b). Para cada *spot* se obtuvieron 2.000 réplicas bootstrap de tamaño $n (= 4)$, mediante un algoritmo Monte Carlo. A partir de la distribución de las 2.000 medias bootstrap generadas, se construyeron los intervalos de confianza (95%) para cada uno de los *spots* utilizando el método de percentiles con corrección del sesgo (Efron, 1982). Los intervalos de confianza bootstrap se corrigieron en múltiples comparaciones con el método de Bonferroni. Estos cálculos se llevaron a cabo con el software R (v. 3.4.0). La relación existente entre *spots* con diferencias estadísticamente significativas en abundancia de proteína se evaluó a través del Análisis de Componentes Principales (PCA). El PCA se realizó con el software XLSTAT (v. 2014.5.03; Addinsoft, Andernach).

La magnitud de los cambios en el volumen de los *spots* entre variedades con diferente longitud de dormancia se cuantificó utilizando las medidas *fold change* (*FC*) y *relative change* (*RC*) (Franco *et al.*, 2015a, b). Los valores de *FC* para cada par de variedades se calcularon mediante las siguientes expresiones: $FC_{\text{Ágata} - \text{Kennebec}} = V_{\text{Kennebec}} / V_{\text{Ágata}}$; $FC_{\text{Ágata} - \text{Agria}} = V_{\text{Agria}} / V_{\text{Ágata}}$; $FC_{\text{Kennebec} - \text{Agria}} = V_{\text{Agria}} / V_{\text{Kennebec}}$. Donde, *V* es el volumen medio de cada *spot* obtenido a partir de las cuatro réplicas de cada variedad. Valores de *FC* menores que 1,0 se reemplazaron por sus recíprocos con signo negativo. Por tanto, el rango de *FC* varía entre $-\infty$ y $+\infty$. La medida *RC* se define como $RC = DV / |$

DV_{\max} |, donde DV es la diferencia del volumen medio de un *spot* dado entre cada par de variedades: $DV_{\text{Ágata} - \text{Kennebec}} = V_{\text{Kennebec}} - V_{\text{Ágata}}$; $DV_{\text{Ágata} - \text{Agria}} = V_{\text{Agria}} - V_{\text{Ágata}}$; $DV_{\text{Kennebec} - \text{Agria}} = V_{\text{Agria}} - V_{\text{Kennebec}}$. Y donde, $|DV_{\max}|$ es el valor de DV más alto (en valor absoluto) observado a lo largo de todas las comparaciones realizadas en el estudio. RC tiene la ventaja sobre la medida FC de que su rango siempre varía entre -1,0 y +1,0.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CAPÍTULO PRIMERO: EVALUACIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS AVANCES EN LA BIOLOGÍA DE LAS SSPs Y VSPs BASADOS EN LA ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

Advances in the biology of seed and vegetative storage proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry

Mouzo, D.; Bernal, J.; López-Pedrouso, M.; Franco, D. and Zapata C.
Molecules 2018, 23, 2462

4.1.1 Terminología y clasificación de proteínas de reserva

Los criterios de nomenclatura de las diferentes clases de SSPs son muy heterogéneos a lo largo de la bibliografía. Entre los criterios más utilizados se encuentran: el coeficiente de sedimentación, el tipo de solvente de extracción o nombres genéricos en latín (Miernyk and Hajduch, 2011). Sin embargo, se ha utilizado tradicionalmente una clasificación propuesta por Osborne (1924) que agrupa las SSPs en función de su solubilidad en diferentes solventes. Bajo este criterio, las SSPs se pueden agrupar en cuatro grandes grupos: albuminas, solubles en agua; globulinas, solubles en solución salina; glutelinas, solubles en ácidos o bases y prolaminas, solubles en una mezcla de alcohol y agua. Por otro lado, las VSPs no poseen una clasificación estandarizada. Esto se debe a que pertenecen a familias proteicas no relacionadas entre sí cuyas características son muy diferentes (Müntz, 1998; Marla *et al.*,

2010; de Souza Cândido *et al.*, 2011). Es por esta razón por la que en el caso de las VSPs se suele recurrir a nombres genéricos. En la tabla 4 se muestra una lista representativa de las proteínas de reserva (SSPs y VSPs) pertenecientes a los cultivos agrícolas más importantes a nivel mundial. Estas SSPs y VSPs son proteínas abundantes, pero los subtipos están representados de manera diferencial. Las cantidades relativas abarcan desde el 1-4% (δ -zeins, *Z. mays*) to hasta el 72% (7S lentil vicilins, *L. culinaris*), mientras que los valores de M_r poseen un rango de 10 (δ -zeins, *Z. mays*) a 130 kDa (HMW-GS glutenins, *T. aestivum*).

Table 4. List of seed and vegetative storage proteins in different crop types.

Crop	Storage Proteins	Percentage of Total Protein	Molecular Weight Subunits (kDa)
Maize (<i>Zea mays</i> L.) ^a	Globulins	12-16	63, 45, 26, 23
		globulin-1 globulin-2	
	Prolamins	50-70	
		α -zeins	22, 19
		β -zeins	14-16
		γ -zeins	27, 16, 50
		δ -zeins	10
Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) ^b	Prolamins	80	
	gliadins	30-50	30-80
		α -gliadins	15-30
		β -gliadins	
		γ -gliadins	
		ω -gliadins	
	glutenins		
		LMW-GS	42-51 (B), 30-40 (C), 58 (D)
		HMW-GS	80-130 (A)
	Globulins		
	11-12S triticeins	5	58 (D), 22 (δ), 52 (A), 23 (α)
	Glutelins	60-80	35-40, 20-22

Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) ^c	Prolamins	20-30	10, 13, 16
	Globulins		
	α-globulins	2-8	26
Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L.) ^d	Patatins	45	39-45
	Kunitz protease inhibitors		20
	Protease inhibitors 1		45
	Protease inhibitors 2		
	Carboxypeptidase inhibitors		10
	Lipoxygenases		97
Soybean (<i>Glycine max</i> L.) ^e	Globulins		
	α-conglycinins		
	7S vicilin/ B-conglycinins	40	76 (α), 72 (α'), 52 (B)
	γ-conglycinins		
	11S legumin/ glycinins	25	56 (G1), 54 (G2), 54 (G3), 64 (G4), 58 (G5)
Barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) ^f	Prolamins		
	hordeins	35-55	
	B-hordeins	15-44	30-45
	C-hordeins	4-11	45-75
	D-hordeins		45
	γ-hordeins		
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.) ^g	Globulins		
	11S helianthinins	38	37-43 (α), 31-35 (α'), 21-30 (B)
	Albumins		
	2S	62	12-20
Common Bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) ^h	Globulins		
	7S phaseolins	40-50	
	11S legumins	3	
	Lectins		
	phytohemagglutinins	5-10	
	α-amylase inhibitors		
Oat (<i>Avena sativa</i> L.) ⁱ	Globulins	10-55	
	3S		48-52
	7S		50-70
	11S		60
	12S avenalins		32-43 (α), 19-25 (B)

	Albumins		10-20	
	Prolamins		12-14	
	Glutelins		23-54	
Pea (<i>Pisum sativum</i> L.) ^j	Globulins			
		7S vicilins		47, 50, 34, 30
		11S legumins		41 (α), 22 (β),
		convincilin		23 (β'),
				78, 72
Chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) ^k	Albumins	2S	12	
	Globulins		50	
		7S vicilins		
		11S legumins		40-47 (α), 24-25 (β)
	Glutelins		18.1	
	Prolamins		2.8	
Pomegranate (<i>Punica granatum</i> L.) ^l	Globulins		40.5	38-54, 13-18
	Albumins		32.2	58-116, 33-46,
	Glutelins		15.6	15-23
	Prolamins		9.7	37, 21-23, 14
				15, 20, 24
Lentils (<i>Lens culinaris</i> Medik.) ^m	Globulins			
		11S legumins	21	38-43
		7S vicilin/convicilins	72	15-59
	Albumins	2S		
Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.) ⁿ	Globulins			
		12S cruciferins	20	29-33 (α), 21-23 (β)
	Albumins	2S napins	60	4-9

^a(Consoli and Damerval, 2001; Shewry and Halford, 2002; Ning *et al.*, 2017); ^b(Payne, 1987; Shewry and Tatham, 1990; Ferranti *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2010; Yadav and Singh, 2011; Guo *et al.*, 2012; Cavazos and Gonzalez de Mejia, 2013; Zhou *et al.*, 2018); ^c(He *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017); ^d(Bártová and Bárta, 2009; Jørgensen *et al.*, 2011; Bernal *et al.*, 2017); ^e(Friedman and Brandon, 2001; Boehm *et al.*, 2017); ^f(Silva *et al.*, 2008); ^g(Youle and Huang, 1981; Zilic *et al.*, 2010; Quiroga *et al.*, 2013); ^h(D'Amico *et al.*, 1992; Montoya *et al.*, 2008; López-Pedrouso *et al.*, 2014a; Joshi *et al.*, 2017); ⁱ(Chang *et al.*, 2011; Cavazos and Gonzalez de Mejia, 2013); ^j(Zilic *et al.*, 2010); ^k(Chang *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2016); ^l(Elfalleh *et al.*, 2010); ^m(Scippa *et al.*, 2010); ⁿ(Schatzki *et al.*, 2014).

4.1.2 Mapas bidimensionales de las proteínas de reserva

Avances técnicos recientes han contribuido a una optimización de la 2-DE. Entre ellos, cabe destacar la utilización de tiras de gradientes de pH inmovilizados, una metodología de extracción de proteínas más eficiente, el funcionamiento de múltiples geles en paralelo y el desarrollo de tintes fluorescentes altamente sensibles y compatibles con la identificación de MS. Por otro lado, también se ha desarrollado software más avanzado para el análisis de las imágenes de los geles (Weiss and Görg, 2007; Wheelock and Wheelock, 2008; Dowsey *et al.*, 2009; Chevalier, 2010; Rabilloud and Lelong, 2011). Los protocolos de extracción proteica desarrollados para grupos de proteínas específicos pueden subsanar en cierta medida las limitaciones de la 2-DE estándar, como es el caso de los análisis de las proteínas de baja abundancia (Görg *et al.*, 2004; Görg *et al.*, 2009; Rabilloud and Lelong, 2011; Gupta *et al.*, 2016). Dentro del marco del estudio de proteomas vegetales, la extracción de proteínas es un paso crítico que determinará en gran medida la calidad final de la 2-DE (Saravanan and Rose, 2004; Carpentier *et al.*, 2005; Faurobert *et al.*, 2007; Weiss and Görg, 2007; de la Fuente *et al.*, 2011). La 2-DE es una tecnología poco automatizada y laboriosa que requiere gran experiencia en su uso para poder explotar todo su potencial.

La 2-DE de alta resolución permite separar, detectar y cuantificar simultáneamente miles de proteínas. Esta técnica se puede aplicar de forma rutinaria para estudiar proteínas abundantes y solubles con una cantidad de 1-2 ng por *spot* expresada en más de 103 copias/célula, un rango dinámico lineal de aproximadamente tres órdenes de magnitud, una masa molecular que abarca desde 15 hasta 150 kDa e intervalos de pH de 2,5 a 12 (Görg *et al.*, 2004; Weiss and Görg, 2007; Rabilloud *et al.*, 2010). Por tanto, la 2-DE posee suficiente capacidad para separar satisfactoriamente la mayoría de las SSPs y VSPs, ya que éstas son

proteínas solubles, abundantes y con un rango de M_r (10-130 kDa) y pI (2,5-12) dentro de sus límites de resolución (Mouzo *et al.*, 2018a, Görg *et al.*, 2004).

La cantidad de proteína de carga en las tiras IPG es un factor clave para la obtención de perfiles de alta resolución de las proteínas de reserva (Bárta *et al.*, 2012; de la Fuente *et al.*, 2012; López-Pedrouso *et al.*, 2014a; Bernal *et al.*, 2017). En la figura 5, se muestran los perfiles bidimensionales de la faseolina y la patatina, las principales proteínas de reserva de *P. vulgaris* y *S. tuberosum*, respectivamente, obtenidos en nuestro laboratorio utilizando diferentes cantidades de proteína de carga (250 μ g y 75 μ g) en las tiras IPG. Cuando la proteína de carga es de 250 μ g, se obtiene una imagen óptima del proteoma global, pero las proteínas de reserva faseolina y patatina ocupan zonas del gel muy saturadas de proteína que impiden su caracterización precisa (Figura 5a). Esta circunstancia ha sido un factor determinante que ha dificultado tradicionalmente la caracterización de las proteínas de reserva en estudios previos basados en la 2-DE. Por el contrario, cuando se baja la proteína de carga a 75 μ g, emergen constelaciones de *spots* bien separados y focalizados que revelan la riqueza de isoformas de la faseolina y la patatina y permite avanzar significativamente en su estudio (Figura 5b). En otros casos, las proteínas de reserva no se identifican como una única constelación de *spots*, sino que pueden formar varias constelaciones distribuidas por el gel (Figura 6). La aplicación de protocolos orientados a la obtención de perfiles bidimensionales específicos de las proteínas de reserva tiene la ventaja adicional de incrementar la potencia estadística en comparación con los protocolos orientados al análisis de los proteomas totales de semilla. Esto es, se reduce el coste estadístico por ajuste de la probabilidad en test múltiples al considerar un número más reducido de *spots*.

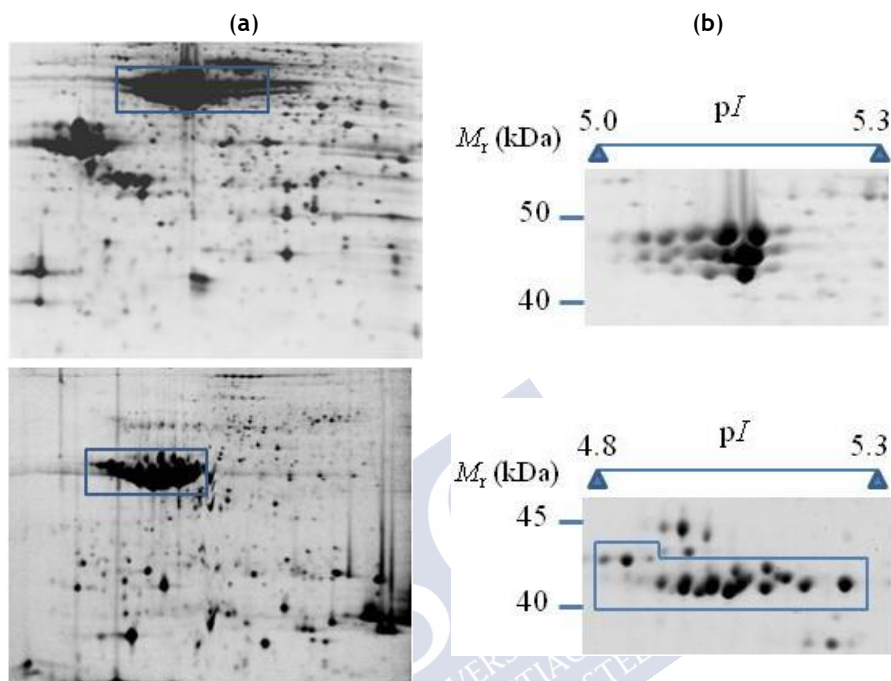


Figure 5. Standard (a) and targeted (b) 2-DE gel images of phaseolin (above) and patatin (below) isoforms from common bean (*P. vulgaris*) seeds and potato (*S. tuberosum*) tubers. Standard 2-DE gels were obtained from 250 μ g of total seed protein or total tuber protein extracts loaded into 24-cm-long IPG strips of linear pH gradient 4-7 in the first dimension. The second dimension (SDS-PAGE) was run on 12% (w/v) SDS-PAGE gels. Gels were subsequently stained with SYPRO Ruby fluorescent stain. Targeted 2-DE gel images for high-resolution profiles were obtained under the same conditions but using only 75 μ g of total protein extracts.

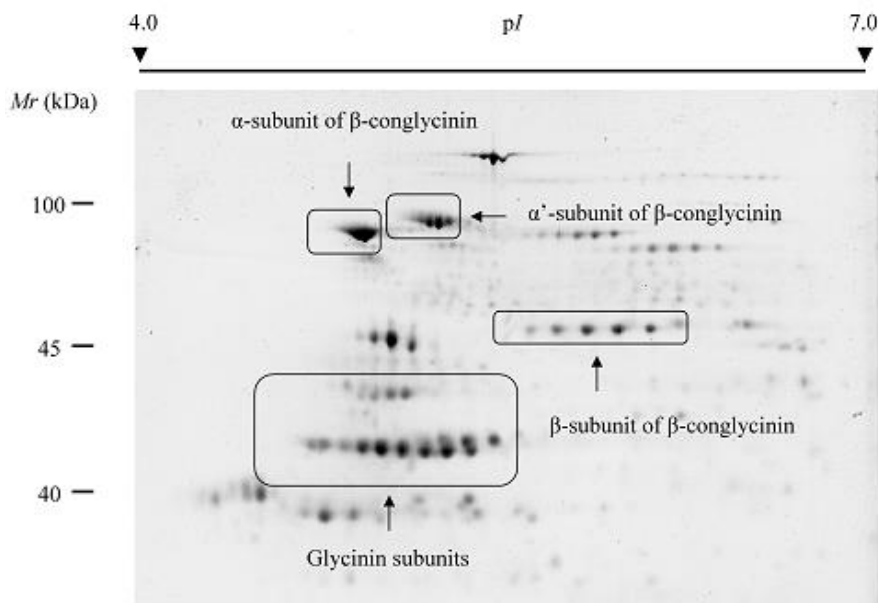


Figure 6. Gel image of high-resolution profile of soybean (*G. max*) storage proteins (β -conglycinin and glycinin subunits) obtained by the targeted 2-DE.

La 2-DE es especialmente útil para el estudio de las modificaciones postraduccionales (PTMs) como las fosforilaciones y glicosilaciones que cambian el pI y/o la M_r de las proteínas (Rabilloud and Lelong, 2011; Rabilloud, 2014). Los mapas bidimensionales de las proteínas de reserva se pueden implementar con la identificación y cuantificación de las isoformas fosforiladas y glicosiladas (Figura 7). La tinción Pro-Q (Pro-Q Diamond Phosphoprotein Stain) es comúnmente utilizada para la identificación y cuantificación en gel de fosfoproteínas (Agrawal and Thelen, 2005; Han and Yang, 2016). Sin embargo, los estudios realizados en la faseolina y la patatina muestran que el método de desfosforilación química de fosfoproteínas mediante fluoruro de hidrógeno-piridina (HF-P) desarrollado por el equipo del Premio Nobel en Química de 2002, Kōichi Tanaka, es más preciso para cuantificar el

nivel de fosforilación proteica que la tinción Pro-Q (Kuyama *et al.*, 2003; López-Pedrouso *et al.*, 2014b; Bernal *et al.*, 2017). Por el método de defosforilación con HF-P, la reducción de volumen de los *spots* defosforilados con respecto al de los *spots* no defosforilados permite cuantificar su nivel de fosforilación.

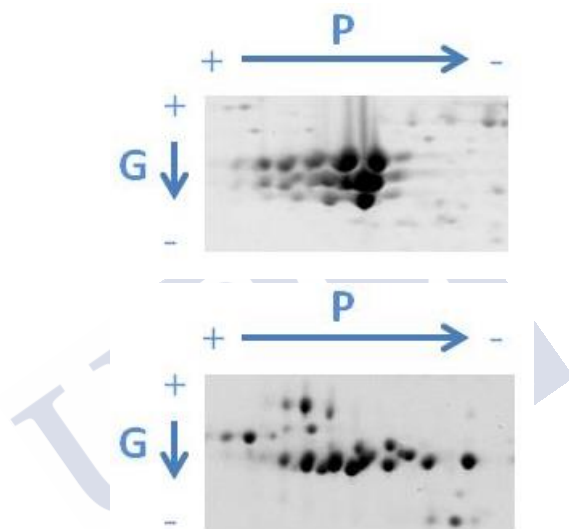


Figure 7. Gel images of differentially phosphorylated (P) and glycosylated (G) isoforms of phaseolin (above) and patatin (below) obtained by targeted 2-DE.

La 2-DE aporta claras ventajas para el estudio de las proteínas de reserva en comparación a tecnologías *gel-free* basadas en MS que típicamente requieren la digestión química o enzimática de proteínas en péptidos para generar los espectros de MS/MS (Silva-Sanchez *et al.*, 2015). La redundancia de péptidos y sitios de fosforilación entre las isoformas de proteínas dificulta la asignación de péptidos específicos a una sola isoforma (Rabilloud, 2014). En particular, es preciso tener en

cuenta que las diferentes isoformas de las proteínas de reserva son codificadas por familias génicas, por lo que comparten una gran porción de su secuencia. Esto es debido a mecanismos de evolución concertada por entrecruzamientos desiguales y conversión génica (Graur and Li, 2000). En el caso de las isoformas de patatina, la homología de secuencia entre los miembros de la familia génica es de al menos el 90% (Mignery *et al.*, 1984; Mignery *et al.*, 1988). Por otro lado, muchos factores pueden inducir a conclusiones erróneas cuando se lleva a cabo un análisis de PTMs a través de MS. Algunos de estos factores son la co-elución de péptidos, la falta de reproducibilidad, la pérdida del grupos fosfato durante la ionización, la transferencia de fosfatos a residuos aceptores o el escaso número de réplicas biológicas que se utilizan habitualmente (Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2013; Rabilloud, 2014; Kim *et al.*, 2015). También, cabe destacar que estas limitaciones son aplicables a otras metodologías basadas en MS utilizadas en proteómica cuantitativa. Entre ellas podemos destacar el caso del etiquetado de isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular (SILAC) o las etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ). Por otra parte, el enriquecimiento de fosfopéptidos suele ser previo al análisis de MS debido a las cantidades subestequiométricas en las que se encuentran muchas fosfoproteínas en las muestras biológicas (Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2013; Silva-Sanchez *et al.*, 2015). Sin embargo, cuando se trata de proteínas de reserva no es necesario el enriquecimiento debido a la gran abundancia de las proteínas fosforiladas. Hoy en día existen diferentes métodos de enriquecimiento de fosfopéptidos como la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) y el dióxido de titanio (TiO₂). Pese a que estos métodos son útiles a la hora de identificar los sitios de fosforilación, tienen como contrapartida la dificultad de poder evaluar de manera fidedigna los cambios cuantitativos relativos entre isoformas.

Por último, las glicosilaciones de las isoformas de proteínas de reserva pueden ser detectadas y cuantificadas a través de diferentes metodologías. Entre ellas se encuentra la tinción fluorescente Pro-Q Emerald, específica de la glicoproteína en gel (Mehta-D'souza, 2012) o la desglicosilación enzimática del extracto proteico (de la Fuente *et al.*, 2012). También se puede recurrir al enriquecimiento de glicopéptidos mediante una columna de cromatografía líquida de interacción hidrofílica zwitteriónica o una cromatografía de afinidad en una columna de concanavalina-A-sefarosa (Duranti *et al.*, 1994; Dam *et al.*, 2013). Sin embargo, las proteínas de reserva glicosiladas se pueden identificar eficientemente por su cambio de M_r en geles 2-DE (de la Fuente *et al.*, 2012; Bernal *et al.*, 2017). Por otra parte, los péptidos glicosilados son difíciles de identificar mediante MS debido a sus cambios de hidrofobicidad/ hidrofiliidad (Rabilloud *et al.*, 2010).

4.1.3 Avances en la biología de las proteínas de reserva

Un gran número de estudios basados en mapas de 2-DE han contribuido sustancialmente a la caracterización de proteínas, subunidades e isoformas de las proteínas de reserva. Además, se ha determinado su abundancia relativa en semillas, sus PTMs, los efectos selectivos de las mutaciones y las variaciones tanto cuantitativas como cualitativas entre variedades (Barbier-Brygoo and Joyard, 2004; Chen and Harmon, 2006; Jorrín *et al.*, 2007; Kersten *et al.*, 2009; Miernyk and Hajduch, 2011; Bárta *et al.*, 2012; de la Fuente *et al.*, 2012; Miernyk, 2014; López-Pedrouso *et al.*, 2014a, b; Silva-Sanchez *et al.*, 2015; Bernal *et al.*, 2017; Ghatak *et al.*, 2017). Incluso, a través de los mapas de 2-DE se ha aportado una valiosa información sobre los cambios dinámicos de las proteínas de reserva durante el desarrollo y la germinación de las semillas (Bernal *et al.*, 2019).

4.1.3.1 Desarrollo de las semillas

Durante el crecimiento del embrión y el llenado de la semilla, las proteínas de reserva se acumulan siguiendo patrones variables. Estos patrones difieren dependiendo del cultivo y del tipo de proteína de reserva. Gallardo *et al.* (2007) observaron que las principales proteínas de reserva de la leguminosa modelo *Medicago truncatula* L. (11S leguminas y 7S vicilinas) eran sintetizadas en una secuencia temporal específica. Además, se observó que se acumulan diferentes cantidades relativas durante el desarrollo de la semilla. Los cambios temporales en abundancia proteica se evaluaron mediante la 2-DE y la posterior identificación proteica se realizó a través de MALDI-TOF y nano-LC-MS/MS. Cabe destacar el hallazgo de una evolución paralela en la expresión del gen *pII*. Dicho gen está implicado en la regulación de la síntesis de arginina, el cual es un aminoácido necesario para la síntesis de proteínas de reserva. Guo *et al.* (2012) a través de su estudio de 2-DE acoplada a MALDI-TOF/TOF MS pudieron concluir que cinco tipos de proteínas de reserva del trigo se acumulaban diferencialmente durante el desarrollo de los granos: γ -gliadinas, globulinas, proteínas similares a la avenina, triticinas y subunidades de glutenina LMW-S. Además, también consiguieron demostrar que para dos variedades de trigo tanto las subunidades de glutelina LMW-S como las de triticinas presentaban una abundancia diferencial en las últimas etapas del desarrollo de la semilla. Sin embargo, las napinas, crucíferinas y oleosinas de la semilla de colza (*Brassica napus* L.) solo se acumulan durante las etapas tempranas y medias del desarrollo (Borisjuk *et al.*, 2013; Gacek *et al.*, 2018). Recientemente, se ha encontrado a través de análisis cuantitativos con 2-DE acoplada a MALDI-TOF/TOF MS que las isoformas de faseolina y patatina se acumulan diferencialmente durante el desarrollo, tanto dentro como entre cultivares de judía y patata respectivamente (Bárta *et al.*, 2012; de la Fuente *et al.*, 2012; López-Pedrouso *et al.*, 2014a, b; Bernal *et al.*, 2017). El análisis de

estos estudios en conjunto sugiere que la acumulación diferencial de las proteínas de reserva durante el desarrollo es de gran significación para su movilización en la germinación.

En relación con las PTMs, la fosforilación reversible es una de las más frecuentes y más ampliamente estudiadas. Estas se encuentran en gran variedad de procesos biológicos de importancia como el ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo, la localización subcelular o las vías de transducción de señales (Friso and van Wijk, 2015; Silva-Sanchez *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2018). Para conocer el papel que juegan estas PTMs en el desarrollo de la semilla son de vital importancia los estudios de cambios de fosforilación temporal en las proteínas de reserva. En los últimos años ha habido un incremento considerable de los análisis sobre fosforilación en SSPs durante el desarrollo, dormancia y germinación de semillas (Tilley and Schofield, 1995; Facchiano *et al.*, 1999; Agrawal and Thelen, 2006; Irar *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007; Ghelis *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2012; Meyer *et al.*, 2012; Quiroga *et al.*, 2013; Kovaleva *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2014; López-Pedrouso *et al.*, 2014a; Dong *et al.*, 2015). Por otro lado, Bernal *et al.* (2017) han aportado las primeras pruebas de fosforilaciones en VSPs a través de estudios realizados en patata.

Diferentes estudios de fosfoproteómica han mostrado como las proteínas de reserva se encuentran abundantemente fosforiladas y desempeñan un papel clave en el desarrollo de la semilla. Meyer *et al.* (2012) estudiaron el desarrollo de semillas de soja, colza y *Arabidopsis* en cinco etapas posteriores a su floración. Llegaron a identificar 2.001 fosfopéptidos y 1.026 sitios de fosforilación en 956 proteínas no redundantes, incluyendo las proteínas de reserva. Cabe destacar que el 25% de dichas fosfoproteínas eran proteínas de reserva con el motivo de fosforilación X-S-D-X. Mapas realizados a través de 2-DE con una previa desfosforilación mediante HF-P mostraron altos niveles de

fosforilación en las isoformas de las proteínas de reserva. Concretamente, las tasas de fosforilación promedio de las isoformas de faseolina y patatina, medidas a través del coeficiente *PR* (*Phosphorylation Rate*), fueron de 46-63% y 34% respectivamente (López-Pedrouso *et al.*, 2014b; Bernal *et al.*, 2017).

Los mapas basados en la 2-DE han demostrado que las isoformas fosforiladas de las proteínas de reserva siguen también patrones muy variables durante el llenado de las semillas. Un primer estudio de Agrawal and Thelen (2006), enfocado a la detección y cuantificación de fosfoproteínas en semillas de colza en desarrollo, mostró que el 40% de las subunidades de crucíferas fosforiladas aumentaban durante el proceso de llenado de las semillas. Sin embargo, las subunidades fosforiladas restantes disminuían con el desarrollo de las semillas. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por Meyer *et al.*, (2012) a través de mapas basados en la 2-DE acoplados con Pro-Q DPS y LC-MS/MS. En ellos se observaron como algunas subunidades de cruciferina fosforilada se encontraban sobrerrepresentadas en la etapa de maduración tardía del desarrollo de la semilla. Protocolos de 2-DE orientados al estudio específico de las proteínas de reserva revelaron que la *PR* en diferentes isoformas de faseolina y patatina de la semilla/tubérculo inactivo se encontraban en el rango de 13-82% y 5-52% respectivamente (López-Pedrouso *et al.*, 2014b; Bernal *et al.*, 2017).

En los cambios de fosforilación de las SSPs y VSPs que ocurren en respuesta al desarrollo de la semilla y cambios ambientales, subyacen complejos mecanismos reguladores que no se conocen todavía lo suficiente. El control de los niveles de fosforilación/desfosforilación tiene lugar a través de la interacción de quinasas, fosfatasa y fitohormonas que participan en las redes de señalización y metabólicas. Como por ejemplo la proteína CK2, una Ser/Thr quinasa eucariótica

con efectos pleiotrópicos que participa en la regulación del crecimiento. Esta proteína también está involucrada en la señalización de ácido abscísico (ABA) (Mulekar and Huq, 2014; Vilela *et al.*, 2015; Montenarh and Götz, 2018). Irar *et al.* (2006) usando mapas de 2-DE junto con la cromatografía de fosfoafinidad para el enriquecimiento de fosfoproteínas encontraron fosforilaciones probables de las proteínas de reserva de la semilla de *Arabidopsis*. Además, partiendo de datos de MALDI-TOF MS y LC MS/MS a través de predicciones *in silico* de los sitios de fosforilación observaron una mayor probabilidad de fosforilación en los residuos de serina debidos a CK2. Por otra parte, la fosfatasa 1 insensible al ABA (ABI1) es un regulador negativo de la señal de ABA que interactúa con las proteínas vinculadas al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Gosti *et al.*, 1999; Ludwików, 2015). Wan *et al.* (2007) demostraron que, durante el desarrollo de la semilla, las cruciferinas de *Arabidopsis thaliana* pueden ser un blanco para la ABI1. Asimismo, los niveles de fosforilación de la cruciferina pueden ser regulados por la ABI1. A su vez, también se observaron niveles diferenciales de fosforilación de tirosina en mutantes ABI1 y tipos silvestres. Esto sugiere que la fosforilación de Tyr está involucrada en la señalización de ABA.

4.1.3.2 Germinación de las semillas

Análisis proteómicos revelaron que la acumulación de proteínas de reserva puede continuar tanto en el inicio de la germinación como en etapas tardías del desarrollo de semilla. Chibani *et al.* (2006) documentaron mediante 2-DE acoplada a MALDI-TOF MS como en *Arabidopsis* los precursores de las cruciferinas se acumulaban durante las últimas etapas del desarrollo de la semilla a través de la síntesis *de novo*. La comparativa de los perfiles bidimensionales de patatina entre tubérculos que iniciaron la germinación y los inactivos permitieron comprender mejor el estado metabólico de las proteínas de reserva

después de la rotura de la dormancia. Lehesranta *et al.* (2006) estudiando el cultivar Desiree demostraron la existencia de diferencias temporales en la abundancia de patatina a lo largo del ciclo del tubérculo. Concretamente observaron que la mayoría de las isoformas aumentan durante el desarrollo, presentando grandes cantidades a la salida de la dormancia. Cantidades que se mantienen constantes hasta que el tubérculo ha brotado completamente. Es en ese momento, cuando las isoformas empiezan a disminuir su abundancia. Estos resultados se encuentran apoyados por estudios de cDNA-AFLP y EST que demuestran que las isoformas de patatina continúan expresándose al comienzo de la brotación del tubérculo (Bachem *et al.*, 2000; Ronning *et al.*, 2003).

Los cambios tanto en abundancia como en fosforilación de las proteínas de reserva han sido monitorizados a través de mapas de 2-DE (Ghelis *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2014; López-Pedrouso *et al.*, 2014b; Dong *et al.*, 2015). Ghelis *et al.* (2008) observaron que las cruciferinas de *Arabidopsis* tratadas con ABA exhibían niveles de fosforilación más altos que las semillas control. Por otra parte, Han *et al.* (2014) a través de la 2-DE acoplada con Pro-Q DPS y MALDI-TOF/TOF MS detectaron que el pico de fosforilación en las cupinas del arroz coincidía con la etapa tardía de germinación y degradación de la proteína. En trigo, Dong *et al.* (2015) demostraron un aumento de la abundancia de globulinas fosforiladas posterior a la imbibición de la semilla. Mediante el análisis de perfiles de 2-DE acoplados con HF-P de la faseolina, se revelaron cambios en la fosforilación durante la transición de semilla seca a la etapa de germinación (López-Pedrouso *et al.*, 2014b). Las modificaciones del estado de fosforilación que no pueden ser explicados por cambios de abundancia de la proteína, sugieren un papel funcional de las mismas (Kim *et al.*, 2015). Las isoformas de faseolina altamente fosforiladas son preferencialmente degradadas en la germinación de la semilla. Estos resultados apoyan la conclusión de que

la degradación dependiente de fosforilación desempeña un papel importante en la movilización de la faseolina. Se ha sugerido que la fosforilación puede provocar cambios conformacionales en la proteína, promoviendo su movilización durante la germinación (Wan *et al.*, 2007). En general, se desconocen los lugares de fosforilación, las rutas moleculares y las quinasas/fosfatasas implicadas en este proceso.

Por otra parte, las glicosilaciones están relacionadas con procesos biológicos como el plegamiento y la estabilidad de proteínas, las interacciones proteína-proteína o la interacción con componentes de membrana (Baginsky, 2009; Strasser, 2014, 2016). La principal modificación co- y postraducciona en plantas es la glicosilación ligada a asparagina (Lerouge *et al.*, 1998). A través de la aplicación de diversas técnicas moleculares se ha podido identificar isoformas glicosiladas en una gran variedad de especies vegetales y tipos de proteínas de reserva. Entre ellas se encuentran las globulinas (7S- y 11S-globulinas y convicilina), prolaminas (γ 3-hordein), albuminas (3S albuminas), glutelinas, patatinas y lectinas (Koshiyama, 1966; Ericson and Chrispeels, 1973; Basha and Beevers, 1976; Hall *et al.*, 1977; Eaton-Mordas and Moore, 1978; Badenoch-Jones *et al.*, 1981; Sengupta *et al.*, 1981; Weber *et al.*, 1981; Chrispeels *et al.*, 1982; Bollini *et al.*, 1983; Lioi and Bollini, 1984; Paaren *et al.*, 1987; Sturm *et al.*, 1987; Duranti *et al.*, 1988, 1994, 1995a, b; Kolarich and Altmann, 2000; López-Torrejón *et al.*, 2003; Lauer *et al.*, 2004; Vaz *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2007; Marsh *et al.*, 2011; de la Fuente *et al.*, 2012; Picariello *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013; Schiarea *et al.*, 2013; Dam *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2016).

4.1.4 Áreas de aplicación en el cultivo de las semillas

4.1.4.1 Calidad de las semillas

Un rasgo esencial en los programas de mejora de las semillas es la calidad proteica. La calidad proteica de las semillas depende principalmente de la composición de aminoácidos esenciales (EAA), el contenido total y la digestibilidad. Las semillas son a menudo deficientes en EAA como lisina, triptófano, treonina y metionina. A modo de ejemplo, la soja y la judía común son deficientes en metionina (Zarkadas *et al.*, 2007; Waglay *et al.*, 2014). Sin embargo, existen excepciones como es el caso de la lisina, limitante en la mayoría de los cereales que puede encontrarse en altas concentraciones en tubérculos de patata (Waglay *et al.*, 2014). Las proteínas de reserva, debido a su gran abundancia, determinan en gran medida la calidad de la proteína de la semilla. En el caso concreto de los cereales, la abundancia relativa de las prolaminas es clave para la calidad proteica debido a su deficiencia en EAA (Yadav and Singh, 2011). A modo de ejemplo, la prolamina zeína del maíz es deficiente en lisina y triptófano seguido de metionina. Esto es especialmente relevante puesto que la zeína representa entre el 50 y 70% de la proteína total (Kiriwara *et al.*, 1988; Lund *et al.*, 1995; Gibbon *et al.*, 2003). La combinación de distintas proteínas de reserva también puede ser determinante para la calidad final de la fracción proteica de las semillas. A título de ejemplo, la conglicina y la glicinina son las principales SSPs de la soja, pero la glicinina contiene de tres a cuatro veces más aminoácidos azufrados que la conglicina (El-Shemy *et al.*, 2007).

Los mapas 2-DE son una herramienta útil a la hora de seleccionar aquellas variedades con isoformas de proteínas de reserva que estén vinculadas con una mejora de la calidad proteica. En el caso del arroz, las variedades silvestres son una fuente de recursos genéticos para la

mejora nutricional del cultivo. Esto se puede lograr a través del aumento del contenido de glutelinas en detrimento de las prolaminas (Jiang *et al.*, 2014, 2016). La comparativa de geles de 2-DE de variedades de arroz cultivado y silvestre reveló nuevas subunidades y precursores de glutelina en el arroz silvestre (Jiang *et al.*, 2014). Además, se encontró que el contenido de glutelina del arroz silvestre chino (*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz.) duplicaba el contenido del cultivo de arroz Indica (Jiang *et al.*, 2016). Zarkadas *et al.* (2007) demostraron mediante análisis de 2-DE la gran variabilidad en abundancia que existe en el contenido de glicinina y la β -conglucina en variedades de soja. A través de esta misma técnica, López-Pedrouso *et al.* (2014a) mostraron que las distancias proteómicas entre diferentes variedades salvajes y cultivadas de la judía común calculadas a partir de la faseína permiten identificar cultivares atípicos con una mayor cantidad de metionina.

Existen diferentes agentes evolutivos que modelan la estructura genética de las poblaciones y pueden generar y/o mantener asociaciones no aleatorias entre alelos de distintos loci (desequilibrio de ligamiento o gamético). Como es el caso de los efectos fundadores, cuellos de botella, endogamia o selección (Hedrick, 2005). Estos factores o combinaciones de ellos operan habitualmente en las poblaciones utilizadas en los programas de mejora vegetal. En consecuencia, las proteínas de reserva codificadas por familias génicas pueden ser utilizadas para la detección de QTL en desequilibrio implicados en caracteres de calidad. En este contexto, varios estudios muestran que el contenido en patatina puede estar correlacionado con la calidad nutricional proteica, el contenido de almidón y el peso medio de los tubérculos de patata (Bárta and Bártová, 2008; Bártová *et al.*, 2015).

La mejora de la calidad de la semilla a través de las proteínas de reserva se abordó mediante diferentes estrategias basadas en transgénicos. Una de las estrategias se basa en la expresión ectópica de

transgenes codificadores de las proteínas de reserva de alta calidad, corrigiendo las deficiencias de la semilla. Shekhar *et al.* (2016) introdujeron en la batata (*Ipomoea batatas* L.) el gen de albúmina AmA1 de *Amaranthus hypochondriacus* a través de *Agrobacterium*. AmA1 es rica en todos los EAA, mientras que la batata es deficiente en triptófano y aminoácidos azufrados. Los mapas 2-DE revelaron que los tubérculos de batata transgénicos presentaban un mayor número de *spots*, sugiriendo que la sobreexpresión de AmA1 tiene un efecto marcado en la adquisición de nutrientes, facilitando un aumento global del contenido proteico y de aminoácidos. Otros enfoques basados en transgénicos también han conseguido la sobreexpresión de una proteína de reserva concreta, cuya calidad es superior al conjunto restante de proteínas. Por ejemplo, la sobreexpresión de glicina en la semilla de soja permite el aumento de los aminoácidos azufrados. Esto es debido a que la glicina se correlaciona negativamente con el contenido de β -conglucina (Ogawa *et al.*, 1989). Por otro lado, El-Shemy *et al.* (2007) transformaron embriones de soja con un gen de proglicina quimérico codificante de una glicina rica en metionina. La acumulación de glicina fue revelada mediante la comparación de perfiles de 2-DE entre líneas de soja transgénicas y no transformadas.

4.1.4.2 Longevidad de las semillas

La longevidad de las semillas secas es un rasgo complejo y esencial para la conservación de la biodiversidad de las plantas cultivadas. Las variables que afectan tanto a la longevidad como al vigor de la germinación pueden ser abióticas y bióticas. Entre ellas se incluyen las condiciones de almacenamiento como la temperatura y humedad y factores genéticos (Bewley and Black, 1994; Sugliani *et al.*, 2009; Dobiesz *et al.*, 2017). Existen evidencias que indican que los sistemas antioxidantes son deteriorados durante el envejecimiento de la semilla, conduciendo a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

y al daño oxidativo (Rajjou *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2018). Las SSPs debido a su abundancia y alta afinidad a la oxidación se someten a una extensa oxidación durante el almacenamiento a largo plazo. Estas suelen ser a menudo carbonilaciones (Rajjou *et al.*, 2008; Kalembe and Pukacka, 2014; Nguyen *et al.*, 2015; Sano *et al.*, 2015). El estudio del envejecimiento de la semilla del arroz, a través de 2-DE acoplada a *western blotting* con anticuerpos antidinitrofenil hidrazona, reveló que las SSPs carboniladas se acumulan en el nodo crítico del envejecimiento. Esto provoca una rápida disminución de la viabilidad de la semilla (Yin *et al.*, 2018). Nguyen *et al.* (2015) a partir del análisis proteómico de mutantes para cruciferina en *Arabidopsis* basados en 2-DE y LC-MS / MS propuso que las SSPs pueden ser amortiguadoras del estrés oxidativo de las semillas. De esta forma las SSPs son capaces de proteger proteínas relevantes para la germinación y el desarrollo de plántulas. Dobiesz *et al.* (2017) haciendo uso de esta misma técnica, informaron que las conglutinas β y δ pueden ser un biomarcador útil de la viabilidad de semillas del altramuza (*Lupinus luteus* L.) durante el almacenamiento a largo plazo.

4.1.4.3 Otras aplicaciones

El análisis de las proteínas de reserva mediante perfiles 2-DE también ha contribuido al desarrollo de otras áreas de aplicación, como antifúngicos, antibacterianos y la susceptibilidad a insectos (Flores *et al.*, 2002; Palomares *et al.*, 2005; Collins *et al.*, 2010; Senakoon *et al.*, 2015), sensibilidad al gluten (van den Broeck *et al.*, 2011; García-Molina *et al.*, 2017), la identificación de alérgenos (Palomares *et al.*, 2005), el estrés por sequía (Hajheidari *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014), la identificación de variedades de trigo en harinas mezcladas (Yahata *et al.*, 2005) y la producción a gran escala de proteínas terapéuticas (Kim *et al.*, 2008).

4.1.5 Conclusiones generales y perspectivas

En este capítulo se muestra como el uso de la 2-DE acoplada a MS es de gran relevancia para avanzar en el conocimiento de las isoformas de las proteínas de reserva, sus cambios dinámicos durante el desarrollo y la germinación de semillas en una amplia diversidad de plantas. Incluso en importantes campos relacionados con la mejora de las semillas. Por esta razón, se espera que el empleo de la 2-DE siga en los próximos años debido a su alta eficiencia en la caracterización de las proteínas de reserva en diferentes escenarios biológicos. La proteómica basada en gel y *shotgun* son estrategias alternativas que poseen ventajas y limitaciones, pero se complementan entre sí. El uso conjunto de estas metodologías probablemente seguirá siendo necesario en el futuro para comprender la compleja biología de las proteínas de reserva. No obstante, a pesar del progreso significativo alcanzado en las últimas décadas, la proteómica se enfrenta a grandes desafíos en los próximos años para desentrañar el complejo rompecabezas molecular de las redes reguladoras que subyacen a las actividades, funciones e interacciones de las proteínas de reserva durante el ciclo de vida de las semillas.

4.2 CAPÍTULO SEGUNDO: ASOCIACIÓN DE DISTANCIAS PROTEÓMICAS BASADAS EN LA PATATINA CON PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA PATATA

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

Association of Patatin-Based Proteomic Distances with Potato
(*Solanum tuberosum* L.) Quality Traits

Mouzo, D.; López-Pedrouso, M.; Bernal, J.; García, L.; Franco, D.; Zapata C.
J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 11864–11872.

4.2.1 Perfiles de 2-DE de la patatina en cultivos de patata

Los perfiles de 2-DE de alta resolución de patatina de los 15 cultivares analizados en este estudio se muestran en la figura 8. Solo se consideraron para el análisis aquellos *spots* reproducibles en réplicas biológicas y previamente identificados como patatinas mediante MS (Bernal *et al.*, 2017). En concreto, los *spots* de los patrones de patatina de mayor M_r no fueron lo suficiente reproducibles entre réplicas (ver figura 8), posiblemente debido a que contenían isoformas precursoras de patatina (Lehesranta *et al.*, 2006). Las imágenes de los geles de 2-DE mostraron, de acuerdo con las observaciones previas, que los perfiles de patatina eran cualitativamente heterogéneos entre cultivares (Bárta *et al.*, 2012). El número de *spots* varió entre 9 (cultivar Desiree) y 22 (cultivar Lady Claire), con un promedio (\pm SE, error estándar) de $16,9 \pm 0,8$. Además, la variabilidad de las patatinas no solo depende del número de *spots*, sino también de sus diferencias en M_r y pI . Por ejemplo, en el caso de los cultivares Amanda y Ambassador, ambos exhibieron el mismo número de *spots* (18 *spots*). Sin embargo, parte de los *spots* exhibieron una M_r y/o un pI distintos. Cabe destacar que cada cultivar presentó un perfil de patatina único y reproducible a través de

réplicas técnicas. Incluso se obtuvieron perfiles reproducibles de muestras de variedades cultivadas en diferentes zonas geográficas (Anexo II). Por lo tanto, esto sugiere que los perfiles cualitativos de patatina obtenidos por la 2-DE tienen una fuerte base genética.

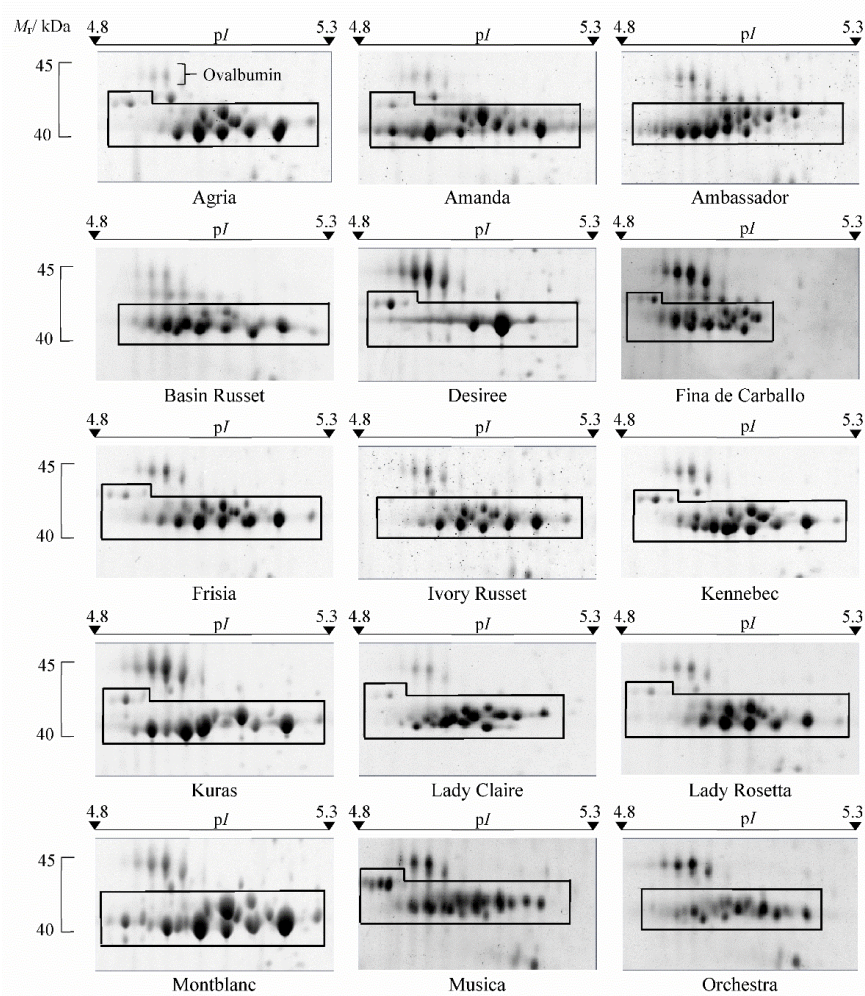


Figure 8. 2-DE images of patatin isoforms obtained from 15 potato cultivars. The polygons delimit reproducible 2-DE spots used for the comparison of patatin profiles. Location of the molecular mass marker ovalbumin (45.0 kDa) is indicated on the gel of the cultivar Agria.

4.2.2 Distancia proteómica entre cultivares

Las distancias proteómicas entre todos los pares posibles de cultivares basadas en los perfiles 2-DE de la patatina se midieron con el coeficiente D . Como se observa en la figura 9A las distancias proteómicas experimentaron una variación notable entre cultivares. Los valores de D variaron desde un mínimo del 13% (Lady Rosetta vs. Ivory Russet) hasta un máximo del 93% (Montblanc vs. Desiree) y presentaron un valor promedio (\pm SE) del $52,5 \pm 1,6$ %. El análisis de agrupamiento UPGMA realizado a partir de la matriz de distancias proteómicas dio lugar a la identificación de un grupo con solo dos cultivares (Desiree y Kuras), claramente separado del resto de los cultivares (Figura 9B). La distancia proteómica (D) media (\pm SE) de Kuras y Desiree fue de $67 \pm 0,02\%$, mientras que en los cultivares restantes la distancia proteómica fue significativamente inferior con un valor medio de $47 \pm 0,02\%$ (valor $P < 0,05$; test U de Mann-Whitney). Estos datos concuerdan con estudios genéticos y proteómicos previos. La construcción de árboles filogenéticos construidos a partir de secuencias de cDNA de la patatina e inhibidores de proteasa Kunitz revelaron que Kuras es un cultivar claramente diferenciado genéticamente del resto de cultivares (Jørgensen *et al.*, 2006). Por otra parte, cabe destacar que el cultivar Desiree es el único genotipo diploide de este estudio y que cultivares diploides y tetraploides están netamente diferenciados a nivel proteico (Lehesranta *et al.*, 2005). En conjunto, estas observaciones sugieren que las isoformas de patatina pueden ser un valioso marcador de la diferenciación genética y proteómica en los cultivares de patata.

4.2.3 Contenido de nutrientes de los cultivares

La calidad del tubérculo para cada uno de los 15 cultivares fue evaluada a partir del contenido de nutrientes siguiente: cenizas, materia seca, azúcares reductores, almidón, proteínas y aminoácidos. Los valores promedio (\pm SE) de las cantidades relativas de cada nutriente (en porcentaje) para cada cultivar se muestran en las tablas 5 y 6. Como se puede observar, las diferencias entre los cultivares dependen en gran medida del tipo de nutriente. Así, la tabla 5 muestra que el coeficiente de variación (CV) fue mayor para el contenido de azúcares reductores (50,8%), almidón (34,2%), proteínas (22,3%) y cenizas (17,2%) que para el contenido de materia seca (13%). En particular, el contenido relativo de proteína varió entre 1,30 (cultivar Orchestra) y 3,17% (cultivar Lady Rosetta). Estos resultados están de acuerdo con la variabilidad en la cantidad de proteína de tubérculo total estimada en estudios previos (Bártová *et al.*, 2015; Calliope *et al.*, 2018). En el estudio no se detectó ninguna relación consistente entre el contenido proteico y el contenido del resto de nutrientes ($P > 0,05$; test de correlación de rango de Spearman). Por el contrario, Leonel *et al.* (2017) encontraron una correlación positiva entre la abundancia de proteínas en cinco cultivares de patata y los contenidos de ceniza y almidón, y una correlación negativa con los contenidos de materia seca y azúcar. La discrepancia entre estudios podría atribuirse a un crecimiento diferencial de las patatas y/o a la existencia de diferencias genéticas entre los cultivares de los distintos estudios. En nuestro caso, los tubérculos se desarrollaron en un conjunto más amplio de condiciones ambientales lo que supone un aumento de las fuentes de variación, incluyendo a su composición química.

Table 5. Ash, Dry Matter, Reducing Sugars, Starch and Protein Content in Tubers of Different Potato Cultivars.

cultivar	Nutrient content (%)				
	Ash	Dry matter	Reducing sugars	Starch	Protein
Agria	0.90 ± 0.09	25.36 ± 0.59	0.15 ± 0.01	13.85 ± 0.61	1.80 ± 0.08
Amanda	1.24 ± 0.00	25.62 ± 0.26	0.21 ± 0.00	14.22 ± 0.60	2.19 ± 0.10
Ambasador	1.11 ± 0.01	22.71 ± 0.39	0.16 ± 0.01	16.06 ± 0.29	2.32 ± 0.01
Basin Russet	1.11 ± 0.05	25.22 ± 0.03	0.14 ± 0.00	18.96 ± 0.29	2.38 ± 0.01
Desiree	0.97 ± 0.02	29.02 ± 0.39	0.23 ± 0.00	27.50 ± 2.99	1.86 ± 0.03
Fina de Carballo	1.53 ± 0.02	26.26 ± 0.06	0.32 ± 0.01	28.94 ± 0.53	2.27 ± 0.04
Frisia	1.56 ± 0.01	23.05 ± 0.42	0.33 ± 0.01	14.80 ± 0.02	1.91 ± 0.04
Ivory Russet	1.13 ± 0.01	24.25 ± 0.09	0.30 ± 0.01	12.66 ± 0.07	1.84 ± 0.03
Kennebec	1.30 ± 0.11	27.89 ± 1.33	0.23 ± 0.01	30.00 ± 1.67	1.54 ± 0.01
Kuras	1.09 ± 0.00	27.78 ± 2.67	0.27 ± 0.02	17.13 ± 2.17	1.81 ± 0.04
Lady Claire	1.14 ± 0.03	27.66 ± 0.91	0.14 ± 0.01	21.41 ± 0.71	2.84 ± 0.08
Lady Rosetta	1.32 ± 0.04	31.03 ± 0.40	0.24 ± 0.00	23.38 ± 1.25	3.17 ± 0.00
Montblanc	1.04 ± 0.01	21.73 ± 1.72	0.24 ± 0.00	11.81 ± 1.27	2.11 ± 0.05
Musica	0.94 ± 0.01	18.76 ± 0.43	0.63 ± 0.02	10.26 ± 0.91	2.27 ± 0.01

Orchestra	1.02 ± 0.03	22.36 ± 0.11	0.11 ± 0.00	17.87 ± 0.21	1.30 ± 0.01
Coefficient of Variation (CV)	17.2%	13.0%	50.8%	34.2%	22.3%

^aData for nutrient contents are means (± SE) obtained from two biological replicates.



Table 6. Amino Acid Composition and Protein Quality Indices in Tubers of Different Potato Cultivars

Amino acids		Cultivar ^a															Coefficient of variation (CV)
		Agria	Amanda	Ambassador	Basin Russet	Desiree	Fina de Carballo	Frisia	Ivory Russet	Kennebec	Kuras	Lady Claire	Lady Rosetta	Montblanc	Musica	Orchestra	
Essential amino acids (EAA)	His	31.7	38.2	32.3	34.9	20.6	40.3	41.0	30.7	31.6	30.8	39.7	50.2	34.4	25.8	23.7	22.8
	Ile	55.6	66.3	55.1	60.5	25.9	60.6	64.9	68.4	49.3	49.7	64.2	79.0	52.1	40.3	37.8	26.4
	Leu	115.8	139.7	113.1	129.7	53.9	103.1	128.9	145.9	96.5	107.4	109.2	164.5	112.0	65.6	60.9	28.9
	Lys	116.7	137.2	109.2	123.8	72.5	114.9	131.8	128.0	106.3	110.7	123.6	167.1	117.1	86.9	79.8	22.2
	Met	18.9	13.2	10.8	14.7	13.9	17.0	10.6	10.5	16.5	26.4	21.4	21.3	10.3	11.3	8.2	37.9
	Phe	77.3	95.0	87.1	83.3	52.8	73.2	98.4	93.4	68.5	68.5	81.9	112.7	73.4	66.4	67.7	19.9
	Thr	71.0	84.0	71.1	78.5	39.8	59.6	74.1	80.9	59.1	70.0	67.7	104.7	79.3	39.9	41.8	26.7
	Val	79.0	89.0	87.8	88.4	54.6	90.7	93.9	91.7	80.4	74.6	99.5	105.7	84.7	78.2	69.1	16.6
	Ala	56.4	65.5	66.8	67.7	34.4	54.1	100.3	72.4	52.0	62.1	56.4	84.8	66.3	57.7	43.4	26.2

	Arg	123.8	151.3	146.8	121.5	64.6	129.4	113.1	119.1	101.4	102.8	176.9	199.6	118.7	112.8	106.3	26.3
Non-essential amino acids (NEAA)	Asp	557.7	413.4	370.5	556	322.2	506.5	309.5	378.1	422.0	269.3	606.2	483.3	281.0	275.3	519.8	28.2
	Cys	26.2	36.6	13.9	26.9	14.5	26.3	31.3	28.1	16.6	26.2	22.8	34.5	27.0	13.3	14.9	115.6
	Glu	269.1	246	317.9	370.3	182.1	282.5	297.6	313.9	240.2	221.4	383.5	283.8	319.7	345.8	281.7	20.2
	Gly	60.7	76.8	56.9	64.2	34.9	59.6	70.8	74.1	50.9	65.5	54.7	86.6	70.3	39.3	35.1	26.0
	Pro	171.5	263.8	218.2	209.1	229.3	324.3	436.2	314.9	221.8	178.4	261.0	340.1	282.9	279.6	268.2	28.2
	Ser	66.2	85.5	68.6	73.0	38.7	67.3	87.6	82.7	61.7	81.8	64.5	96.7	89.7	51.9	54.4	23.6
	Tyr	45.9	55.0	50.3	62.9	35.9	42.6	70.2	64.7	40.7	47.4	53.4	66.6	56.0	38.2	34.0	24.7
Total amino acids		1944	2057	1876	2165	1290	2051	2160	2098	1715	1593	2287	2481	1875	1628	1747	17.5
PDCAAS		34.7	23.0	20.4	24.3	37.1	29.6	17.5	17.6	33.8	58.9	33.6	30.5	19.6	24.7	16.7	40.9
EAAI		63.1	66.4	62.1	59.6	52.2	60.5	60.5	61.15	64.4	75.9	58.9	69.3	61.5	54.1	46.4	12.4

^aData for amino acid composition are means obtained from three biological replicates expressed as a percentage.

El análisis de los perfiles de aminoácidos para los 15 cultivares se muestran en la tabla 6. Se puede observar que tanto la lisina como la leucina son los EAA más frecuentes en todos los cultivares. Mientras que por otro lado, la metionina siempre es el EAA que se encuentra con una menor frecuencia. Para la mayoría de los casos (10 de los 15 cultivares), el contenido del aminoácido lisina fue significativamente mayor en comparación con la leucina ($P < 0,05$; test de rangos con signo de Wilcoxon). Las concentraciones más altas de lisina concuerdan con los perfiles de EAA reportados previamente en la literatura (Waglay *et al.*, 2014; USDA, 2019). Cabe también mencionar la existencia de una variación pronunciada de cultivar a cultivar con respecto al contenido del aminoácido limitante metionina, que varió de 8,2 a 26,4% ($P < 0,05$; test de Kruskal-Wallis). De hecho, fue éste el EAA con un mayor nivel de variación en el presente estudio ($CV = 37,9\%$; $P < 0,05$; test del signo).

La calidad nutricional de las proteínas de los tubérculos de los 15 cultivares de patata se evaluó mediante ensayos PDCAAS y EAAI (Tabla 6). En ambos métodos se evalúan diferentes aspectos de la calidad de la proteína (Schaafsma, 2005; Olu and Adediran, 2015). Por una parte, el PDCAAS se basa en la relación de la cantidad del primer EAA limitante de la proteína problema en comparación con la cantidad del mismo aminoácido de la proteína de referencia. Esta comparativa se corrige por la verdadera digestibilidad del nitrógeno fecal de la proteína problema, medida en un ensayo en rata. Por otro lado, el EAAI proporciona una información acerca de la contribución total de EAAs a la calidad nutricional de la proteína. En nuestro estudio encontramos que los valores de PDCAAS fluctuaron acusadamente entre cultivares, oscilando entre 16,7 en el cultivar Orchestra y 58,9% en el cultivar Kuras ($P < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis). Este es un resultado esperado teniendo en cuenta que, como se mencionó anteriormente, el primer EAA limitante en nuestro estudio fue la metionina que

experimentó oscilaciones significativas entre los cultivares. Por otro lado, los valores del EAAI variaron de 46,4 (cultivar Orchestra) a 75,9% (cultivar Kuras) con un valor promedio (\pm SE) de $61,0 \pm 1,13\%$ ($P < 0,05$, prueba de Kruskal-Wallis). Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores, los cuales observaron valores de EAAI dentro de este rango de variación (Mitrus *et al.*, 2003). Cabe destacar que el valor del EAAI calculado a partir del patrón de referencia para la dieta de niños y niñas en edad preescolar (2-5 años) fue de 65,2%, excluyendo triptófano (FAO/WHO, 1991). Por lo tanto, algunos cultivares comerciales de patata considerados en el presente estudio contienen una cantidad de EAA por debajo de la puntuación óptima.

Nuestras observaciones indican que los 15 cultivares de patata utilizados en este estudio contienen importantes niveles de variación natural relativa a la calidad nutricional del tubérculo. Por tanto, podría tratarse de un material biológico adecuado para evaluar si las distancias proteómicas estimadas entre los distintos cultivares se asocian con rasgos de calidad de tubérculos.

4.2.4 Asociación entre las distancias proteómicas y parámetros de calidad del tubérculo.

En este estudio se llevó a cabo un análisis de la asociación entre las distancias proteómicas basadas en la patatina y las diferencias en el contenido de nutrientes entre pares de cultivares de patata. Para ello se utilizó el coeficiente no paramétrico de correlación de Spearman (Tabla 7; Anexo III).

Table 7. Relationship between Proteomic Distances (*D*) and differences in the Nutrient Content Across Pairs of Potato Cultivars.

Nutrient content	r_s^a	<i>P</i> -value ^b
Ash	-0.203	0.038
Dry matter	+0.194	0.047
Reducing sugars	+0.007	0.944
Starch	+0.027	0.783
Protein	-0.080	0.419

^aNon-parametric Spearman's rank correlation coefficient; Sample size (n) = 105. ^bAdjusted *P*-values by the Benjamini and Yekutieli method.⁵²

La variación del contenido de cada nutriente entre pares de cultivares se evaluó a través de la diferencia de los valores medios expresados en valor absoluto. El análisis reveló una correlación negativa y positiva de las distancias proteómicas con las diferencias en el contenido de ceniza y materia seca, respectivamente ($P < 0,05$). Estos resultados sugieren, por tanto, que las distancias proteómicas podrían utilizarse para la detección de variaciones en la cantidad de ceniza y materia seca en los diferentes cultivares de patata. El contenido en materia seca es un factor muy relevante en la calidad final del frito de la patata en tiras. Esto es debido a que la materia seca influye en las cantidades de grasa que se absorben durante la fritura. En las variedades analizadas en el presente estudio, los valores de materia seca oscilaron entre 18,8 (cultivar Musica) y 31% (cultivar Lady Rosetta), alcanzando un valor medio (\pm SE) de $25,3 \pm 0,6\%$ (Tabla 5). Por tanto, el contenido de materia seca para algunos cultivares se desvió de los valores óptimos requeridos para la obtención de un producto en frito de buena calidad

cuando se estima que el óptimo es del 18-22% (Waldron, 2004; Miranda and Aguilera, 2006). Sin embargo, desviaciones de los valores óptimos son frecuentes antes y después de un período de almacenamiento (Murniece *et al.*, 2011). Por otro lado, el contenido en ceniza es un indicador de la cantidad de minerales nutricionalmente importantes (Pomeranz and Meloan, 1994). Estudios previos sugieren que el contenido en cenizas tiende a aumentar a medida que aumentan los niveles de nitrato de potasio (Haddad *et al.*, 2016).

Las distancias proteómicas basadas en patatina mostraron asociación con parámetros de calidad de las proteínas. La relación de los valores de D con las diferencias en el contenido medio de cada aminoácido para los 15 cultivares se analizó utilizando el coeficiente de correlación paramétrico de Pearson (r). Esto es debido a que las distribuciones de muestreo de las variables se distribuían normalmente después de la transformación del arcoseno ($P > 0,05$; test de Shapiro-Wilk). El análisis resultante reveló una correlación positiva entre las distancias proteómicas y las diferencias medias en la cantidad de cinco EAA individuales: isoleucina, leucina, lisina, treonina y valina ($P < 0,05$, Anexo I). Además, las distancias proteómicas se correlacionaron significativamente con las diferencias medias del EAAI ($r = 0,328$; $n = 105$; $P < 0,05$) (Figura 10). Entre las distancias proteómicas y el contenido de almidón no fue detectada ninguna correlación. Esto no excluye la posible existencia de algún tipo de relación entre la patatina y el contenido en almidón. De hecho, Bárta and Bártová (2008) encontraron una correlación positiva débil, pero significativa, entre la abundancia de patatina y el contenido de almidón en tubérculos de patata.

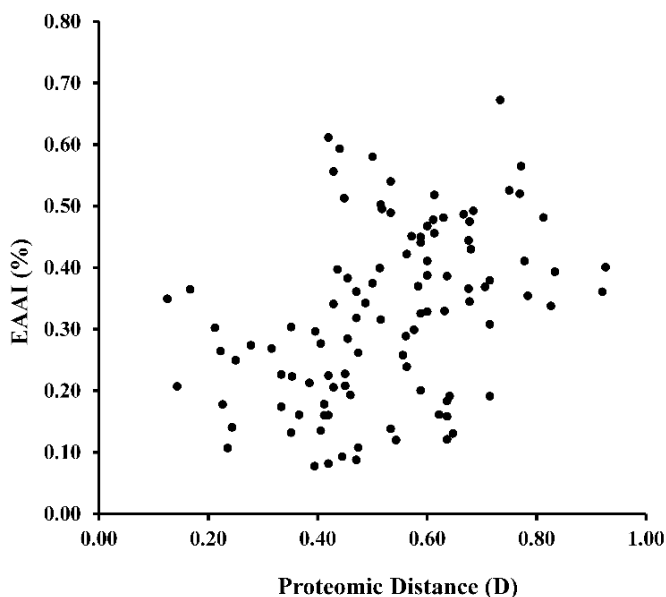


Figure 10. Relationship between proteomic distances (D) and differences in the essential amino acid index (EAAI) between pairs of potato cultivars.

Las observaciones antes mencionadas mostraron como las distancias proteómicas basadas en la patatina para los cultivares Kuras y Desiree se diferencian significativamente del resto de cultivares de patata. Estos dos grupos de cultivares también mostraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de materia seca, proteínas y valores de PDCAAS ($P < 0,05$; test U de Mann Whitney). Específicamente, el contenido de materia seca y valores de PDCAAS en Kuras y Desiree alcanzaron valores medios inferiores en comparación con los restantes cultivares, mientras que para el contenido de proteínas se detectó la tendencia opuesta (Figura 11).

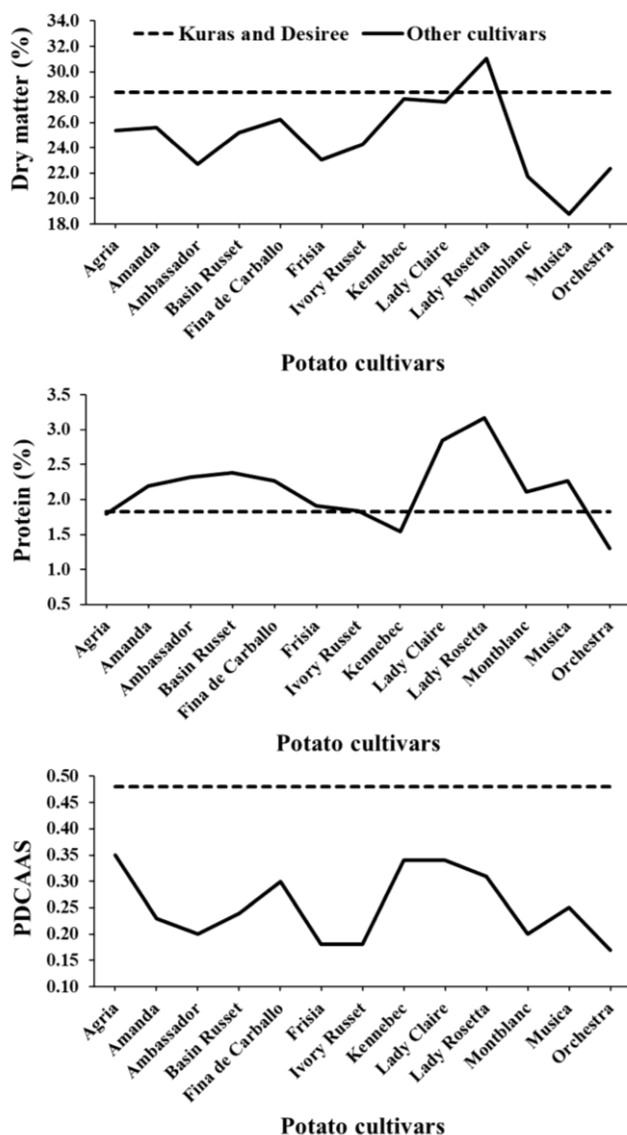


Figure 11. Comparison of the content in dry matter, content in protein, and PDCAAS values for cultivars Kuras and Desiree versus the rest of the potato cultivars. Dashed lines are mean values over replicates of Kuras and Desiree cultivars. Continuous lines are mean values over replicates of each of the remaining cultivars.

Los resultados del estudio sugieren que las distancias proteómicas basadas en la patatina pueden ser un marcador útil en la identificación de cultivares atípicos para caracteres de importancia en la calidad del tubérculo. Es importante subrayar que Kuras y Desiree son los cultivares de nuestro estudio con el mayor grado de diferenciación genética y proteómica. Esta concordancia entre la diferenciación proteómica y la genética sugiere que la proteómica puede ser de gran utilidad para la mejora genética de los cultivares de patata.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las distancias proteómicas basadas en patatina están asociadas con diferencias importantes en parámetros de calidad proteicos y no proteicos entre los cultivares de patata. Estos hallazgos sugieren que el uso de la extensa variación natural existente en las isoformas de patatina puede conducir a una selección más rápida de cultivares genéticamente diferenciados con las características deseadas para la mejora del cultivo. Estudios futuros deberán determinar si las distancias proteómicas basadas en la patatina son marcadores de una gama más amplia de parámetros de calidad del tubérculo de patata.

4.3 CAPÍTULO TERCERO: IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS INVOLUCRADAS EN LA DURACIÓN DE LA DORMANCIA DEL TUBÉRCULO DE PATATA

Este capítulo reproduce contenidos del siguiente artículo:

Proteomic insights into the differential length of dormancy period in potato

Mouzo, D.; Rodríguez-Vázquez, R.; López-Pedrouso, M.; Barrio, D.;
Franco, D.; García, L.; Zapata C.
En preparación

4.3.1 Desarrollo del tubérculo

Las variedades de patata exhiben grandes variaciones en la duración de la dormancia del tubérculo que pueden oscilar entre 15 y 197 días (Bogucki and Nelson, 1980; Fauconnier *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016). El genotipo es el factor que tiene una mayor influencia en las variaciones del tiempo de dormancia aunque diferentes condiciones ambientales en el cultivo o durante el almacenamiento también pueden afectar y modificar su duración (Simmonds, 1964; Viola *et al.*, 2007; Aksenova *et al.*, 2013; Eshel, 2015; Suttle *et al.*, 2016). Los genotipos Ágata, Kennebec y Agria utilizados en este estudio se caracterizan por poseer duraciones de dormancia corta, media y media-larga, respectivamente (Sorce *et al.*, 2009; ECPD, 2020). Los tiempos de dormancia característicos de estos cultivares se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo y almacenamiento del presente trabajo. Así, la duración media del periodo de dormancia en las variedades Ágata, Kennebec y Agria fue de 15, 53 y 62 días respectivamente (Tabla 8). Estos resultados confirman que aunque la brotación es un proceso complejo en el que interactúan de manera coordinada factores ambientales y genéticos, el genotipo es el factor principal que afecta la

duración de la dormancia (Liu *et al.*, 2015; Mouzo *et al.*, 2018a). Lo más relevante para nuestro estudio es que disponemos de tubérculos de las tres variedades de patata con diferentes periodos de dormancia que se han obtenido en condiciones de cultivo homogéneas. Esto nos permite acometer el estudio de los cambios del proteoma global del tubérculo asociados con diferencias en la duración de la dormancia.

Table 8. Average duration of dormancy period in potato tubers of cultivars Agata, Kennebec and Agria under the same environmental conditions.

Varieties	Pedigree ^a	Origin ^a	Average duration (\pm SE) of dormancy (in days)
Agata	BM 52/72/2206 \times Sirco	Holland	15,3 (\pm 0.3)
Kennebec	B127 \times USDA X96 56	USA	53,5 (\pm 2.0)
Agria	Quarta \times Semlo	Germany	62 (\pm 3.0)

^a(Favoretto, Veasey and Melo, 2011; AHDB, 2017; ECPD, 2020).

4.3.2 Proteomas diferenciales en la dormancia

Los perfiles proteómicos globales se obtuvieron mediante la 2-DE para cada una de las tres variedades a partir de muestras de tubérculos endodormantes, inmediatamente después de la cosecha (Figura 12). Para poder realizar el estudio de la proteína global se partió de muestras de 400 μ g de proteína total de tubérculo como se indica en el apartado de Material y Métodos. Por tanto, las isoformas de patatina, localizadas en los geles bidimensionales a una M_r de 40,0-45,0 kDa y un pI de 4,8-

5,3, se excluyeron del estudio. Como ya se ha mencionado anteriormente, el estudio de las múltiples isoformas de la patatina con un buen nivel de resolución requiere concentraciones más bajas (75 μ g) de proteína de carga. El análisis de los perfiles bidimensionales de alta resolución mediante el software PDQuest permitió identificar para las tres variedades un total de 883 *spots*, de los cuales solo 345 *spots* fueron reproducibles en al menos tres de las cuatro réplicas. El cálculo de los intervalos de confianza bootstrap al 95% para los volúmenes medios de los *spots*, mediante el método de percentiles con la corrección de sesgo, reveló un total de 78 *spots* con diferencias estadísticamente significativas entre pares de variedades. El análisis PCA mostró que las tres variedades del estudio se separan nítidamente considerando estos 78 *spots* con una abundancia proteica diferencial (Figura 13). En primer lugar, estos resultados muestran que la 2-DE es capaz de identificar cultivares de patata con diferente longitud en el periodo de dormancia. Más importante aún, es que las variaciones en la duración de la dormancia están ligadas con cambios considerables en el proteoma global del tubérculo.

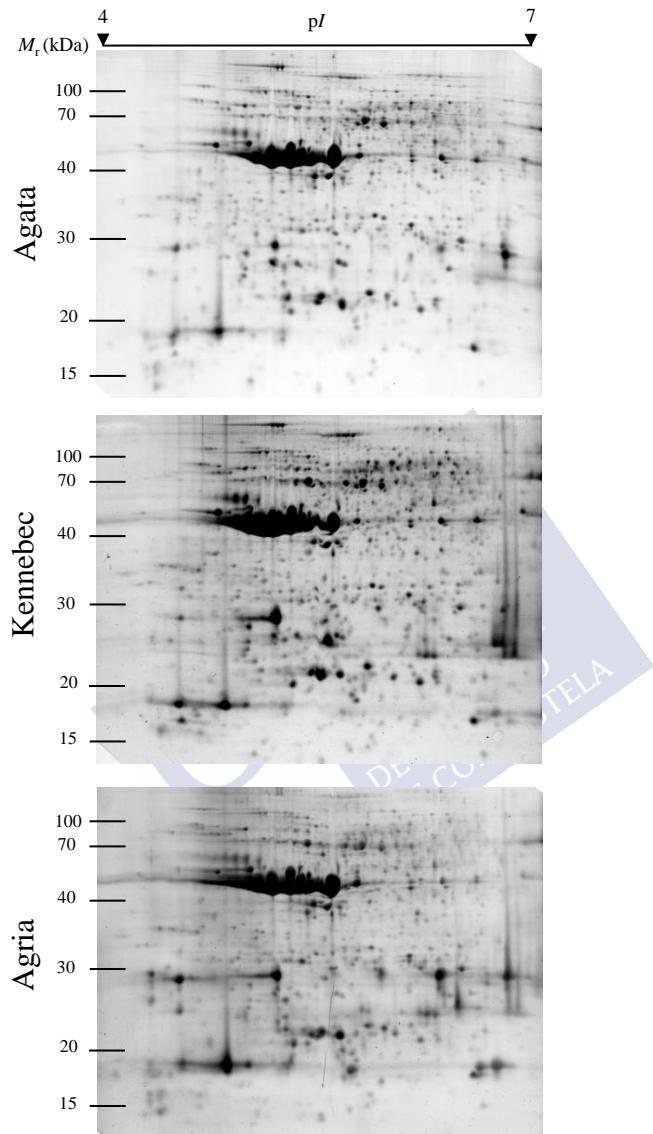


Figure 12. Gel image of high-resolution profile from the potato cultivars in endodormancy obtained by 2-DE.

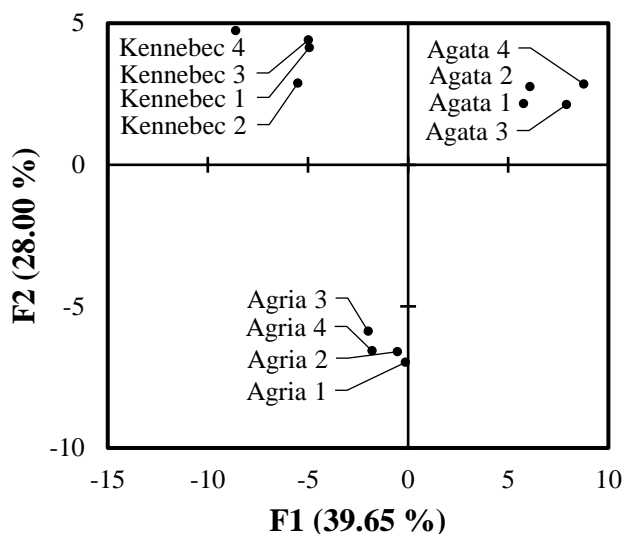


Figure 13. Principal component analysis (PCA) of the four replicas for each of the varieties using the volume of 78 differential abundance ($P < 0.05$) spots of the endodormancy stage.

4.3.3 Identificación de proteínas

Los 78 *spots* con diferencial abundancia proteica ($P < 0,05$) entre pares de variedades se analizaron mediante LC-Triple-TOF/MS. Un total de 52 de los 78 *spots* se identificaron con un nivel de confianza superior al 95%. En 38 de los *spots* se identificaron más de una proteína, lo que dificulta determinar cuál o cuáles de estas proteínas ha experimentado cambios en abundancia entre variedades. En consecuencia, estos 38 *spots* se eliminaron para los análisis posteriores. Finalmente, los *spots* con una abundancia diferencial estadísticamente significativa que albergan una única proteína identificada se redujeron a 14 (Anexo IV). Su localización en los geles 2-DE para cada una de las variedades se muestra en la Figura 14.

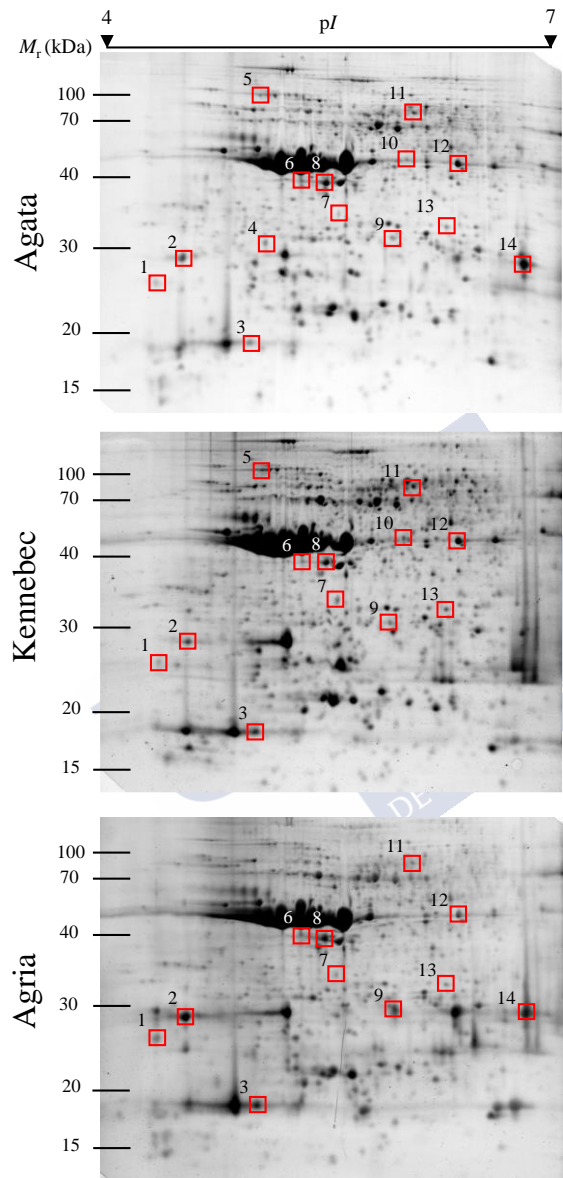


Figure 14. 2-DE images of global endodormancy proteomes from the potato cultivars. Squares indicate the fourteen spots that house a single protein differentially expressed and identified by LC-Triple-TOF/MS.

La relación de las proteínas únicas identificadas por *spot* con una abundancia diferencial entre variedades se muestra en la tabla 9. Entre ellas, 4 proteínas se corresponden con la ADP, ATP translocasa mitocondrial (AAC), una proteína transportadora que se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Las AACs llevan a cabo el intercambio entre el ATP generado durante la fosforilación oxidativa en el interior de la matriz y el ADP citosólico (Haferkamp, 2007; Klingenberg, 2008). Por otro lado, entre las identificaciones también se encuentra una alta representación de inhibidores de proteasa. Concretamente se identificaron dos inhibidores de serina proteasa (SPI) y un inhibidor de aspartato proteasa (API). Estas proteínas inhibidoras de proteasas poseen actividades de defensa contra patógenos. Por esta razón, su abundancia diferencial en los tubérculos podría estar influenciada por la presencia de patógenos. Fernández *et al.* (2012) mostraron como varias APIs y la misma isoforma de SPI que se identificó en este estudio (inhibidor de serina proteasa 2) se sobreexpresaban tras infectar tubérculos con *P. infestans*. Recientemente, se descubrió que el crecimiento de *P. infestans* y *R. solani* entre otros patógenos se redujo debido a los inhibidores de la proteasa de la patata (Bártová *et al.*, 2019). Por esta razón, dichas SPIs e APIs han sido descartadas del estudio de las diferencias de dormancia entre variedades, por la potencial influencia externa debida a su actividad de defensa contra patógenos.

Otra de las proteínas identificadas es el homólogo de la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP). TCTP es una proteína altamente conservada que se ha relacionado con funciones como la organización de los microtúbulos, la regulación de la actividad de GTPasa o la apoptosis (Bommer and Thiele, 2004). Por otro lado, también ha sido identificada una fructoquinasa (FRK). Esta proteína realiza el control de la catálisis de la fosforilación del sexto carbono de la fructosa, formada junto con una glucosa tras la escisión de sacarosa

por la acción de la invertasa (Pego and Smeekens, 2000; Davies *et al.*, 2005). Otra proteína identificada fue la catalasa 2 perteneciente a la familia de las catalasas (CATs). Esta enzima es responsable de la reducción de los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) que se generan junto con otras ROS durante la dormancia del tubérculo y como respuesta a las mazaduras (Bajji *et al.*, 2007a, b; Mani *et al.*, 2014). En el tubérculo, la CAT reduce aproximadamente el 65% del H_2O_2 generado, transformándolo a $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Mientras que el porcentaje restante de H_2O_2 es reducido a través de la ascorbato peroxidasa y la glutatión peroxidasa (Mani *et al.*, 2014). También se identificó la enzima linolato 9S-lipoxigenasa 2 perteneciente a las lipoxigenasas (LOXs). Las LOXs son una amplia familia enzimática responsable de la síntesis de oxilipinas a través de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) (Göbel *et al.*, 2001). Concretamente, la LOX identificada en este estudio es responsable de la síntesis del ácido (9S, 10E, 12Z) -9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoico (9-HPODE). Este es el producto predominante de las LOXs en el tubérculo de patata, excepto cuando el tubérculo está infectado o con lesiones, donde será otra LOX la que active las respuestas de defensa (Reddy *et al.*, 2000). Por último, fueron identificadas las proteínas de choque térmico de 70 kDa e isoformas de patatina. Las proteínas de choque térmico de 70 kDa se caracterizan por su actividad como chaperonas mitocondriales y las isoformas patatinas por su actividad como proteínas de reserva y resistencia frente a patógenos (Morelli *et al.*, 1998; Zhang and Glaser, 2002; Bártoová *et al.*, 2019; Bernal *et al.*, 2019).

Table 9. List of identifications of differentially expressed proteins ($P < 0.05$) in spots hosting a single protein through LC-Triple-TOF/MS.

Nº	Unused	% Protein	Sequence	Peptides	Accession	Protein	Abbrev.	pI	M_r (kDa)
Spot	ProtScore	confidence	Cov. (%)	(95%)				(th/obs)	(th/obs)
1	3.63	>99	45.24	0	P43349	Translationally-controlled tumor protein homolog	TCTP	4.6/4.1	18.8/26.1
2	5.28	>99	22.04	3	P58515	Serine protease inhibitor 2	SPI 2	4.9/4.2	20.1/28.4
3	2.53	>99	30.11	2	P58515	Serine protease inhibitor 2	SPI 2	4.9/4.5	20.1/18.0
4	1.92	99	11.92	3	P25083	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	9.8/4.6	42.1/30.5
5	1.37	96	1.17	1	Q08276	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	mt-Hsp70	5.4/4.6	73.1/98.4
6	1.53	97	8.02	0	Q3YJT3	Patatin-2-Kuras 1	pat2-K1	5.1/5.0	41.1/39.8
7	3.86	>99	14.25	1	P25083	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	9.8/5.3	42.1/33.6

8	4.51	>99	14.42	2	P37829	Fructokinase	FRK	5.5/5.2	33.8/39.3
9	6.00	>99	9.07	3	P25083	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	9.8/5.8	42.1/31.2
10	2.00	99	3.10	1	Q3YJT5	Patatin-05	Pat-05	5.4/6.0	42.5/42.0
11	18.26	>99	19.16	9	O24379	Linoleate 9S-lipoxygenase 2	Linolate 9S-LOX 2	5.4/6.1	97.1/85.3
12	4.99	>99	12.20	2	P55312	Catalase isozyme 2	CAT 2	6.6/6.5	56.5/41.6
13	2.10	99	17.62	1	P25083	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	9.8/6.4	42.1/32.4
14	3.74	>99	44.09	4	P17979	Aspartic protease inhibitor 8	API 8	6.5/7.0	24.2/28.9

Unused ProtScore is a measure which reflects the unique peptides to a given protein. The protein confidence threshold was set greater than 95% by the following formula $\text{Unused ProtScore} = -\log(1 - \% \text{ confidence}/100)$. Sequence coverage (%) is the proportion of amino acids that match the peptides identified, having a confidence greater than 0 and subsequently divided by the total amino acids in the sequence. Peptides (95%) indicates the number of peptides identified with at least 95% confidence (Oda *et al.*, 2012; Qian, Tian and Qu, 2015).

4.3.4 Proteínas candidatas en la duración de la etapa de dormancia

La intensidad de los cambios en la abundancia de proteínas entre cultivares con diferente duración de la dormancia, estimada con las medidas *fold change* (*FC*) y *relative change* (*RC*), se muestra en la tabla 10. Se observa que ambas medidas proporcionan resultados dispares. *FC* es una medida utilizada tradicionalmente para estimar los cambios de abundancia de las proteínas entre tratamientos, pero su uso generalizado tiene serios inconvenientes (Franco *et al.*, 2015a, b; López-Pedrouso *et al.*, 2018). Su rango de variación entre $-\infty$ y $+\infty$ dificulta valorar las diferencias de los cambios en abundancia de las distintas proteínas. Además, la medida siempre toma valores extremos ($-\infty$, $+\infty$) cuando las proteínas son únicas y no son compartidas entre tratamientos, independientemente de sus diferencias de cantidad. *RC* es una medida introducida recientemente para estimar los cambios en abundancia proteica (Franco *et al.*, 2015a, b). A diferencia de *FC*, el rango de *RC* tiene la importante propiedad de que siempre varía entre -1,0 y +1,0, ya sea para proteínas compartidas o no compartidas entre tratamientos. La utilidad de *RC* se ha puesto de manifiesto en una gran diversidad de escenarios proteómicos (Franco *et al.*, 2015a, b; López-Pedrouso *et al.*, 2018; López-Pedrouso *et al.*, 2019; Mato *et al.*, 2019; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2020). En el presente estudio, los cambios más pronunciados de *RC* se detectaron para la proteína FRK (*RC* = -1,0) entre las variedades Ágata y Kennebec y la proteína AAC (*RC* = -0,489) entre los pares de variedades Ágata-Kennebec y Ágata-Agria.

Table 10. *FC and RC of differentially abundant proteins in pairwise comparisons of potato cultivars.*

N.º Spot	Protein	Abbrev.	Agata- Kennebec		Agata- Agria		Kennebec- Agria	
			<i>FC</i>	<i>RC</i>	<i>FC</i>	<i>RC</i>	<i>FC</i>	<i>RC</i>
1	Translationally-controlled tumor protein homolog	TCTP	-1.80	-0.187	ns	ns	ns	ns
4	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	-∞	-0.489	-∞	-0.489	N/A	N/A
5	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	mt-Hsp70	ns	ns	-∞	-0.260	-∞	-0.311
6	Patatin-2-Kuras 1	pat2-K1	ns	ns	ns	ns	+1.59	+0.116
7	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	+1.49	+0.090	ns	ns	ns	ns
8	Fructokinase	FRK	-2.13	-1.000	ns	ns	ns	ns
9	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	-1.65	-0.125	ns	ns	ns	ns
10	Patatin-05	Patatin-05	ns	ns	-∞	-0.188	-∞	-0.202
11	Linoleate 9S-lipoxygenase 2	Linolate 9S-LOX 2	-1.32	-0.097	-1.73	-0.167	-1.31	-0.070
12	Catalase isozyme 2	CAT 2	-1.49	-0.391	ns	ns	ns	ns
13	ADP, ATP carrier protein, mitochondrial	AAC	-1.36	-0.068	-1.34	-0.065	ns	ns

Las proteínas TCTP y FRK están representadas en una mayor cantidad en la variedad Ágata que en la variedad Kennebec. Por tanto, se encuentran en una mayor cantidad en la variedad cuya dormancia es más corta. Estos datos concuerdan con los de investigaciones previas en *A. thaliana* donde se encontró que el silenciamiento de TCTP provoca un lento crecimiento vegetativo (Berkowitz *et al.*, 2008). La proteína TCTP se identificó como un regulador del crecimiento de las plantas al tratarse de un mediador de TOR, una quinasa promotora del crecimiento celular. Por esa razón, TCTP posee un papel importante en la regulación del crecimiento (Gutiérrez-Galeano *et al.*, 2014). Por otro lado, la FRK actúa en la regulación del metabolismo de carbohidratos, desempeñando un papel clave en el desarrollo de los tejidos vasculares del tubérculo (Granot *et al.*, 2013). Davies *et al.* (2005) concluyeron que la inhibición de la FRK en patatas no solo afecta el equilibrio entre la degradación y la síntesis de sacarosa, sino que también reduce la productividad del tubérculo.

El segundo cambio relativo más pronunciado de este estudio después de la FRK pertenece a la AAC identificada en el *spot* número 4, el cual se detectó exclusivamente en la variedad Ágata. Además, el resto de las AACs identificadas mostraron una mayor expresión en Ágata en comparación con Kennebec y Agria a excepción de la identificada en el *spot* 7. El transporte enzimático de ATP que llevan a cabo estas enzimas AACs se encuentra regulado por la demanda variable de ATP citosólico. Cabe destacar que este transporte condiciona en mayor medida la fosforilación oxidativa mitocondrial que la síntesis de ATP (Pfaff *et al.*, 1965; Klingenberg, 2008). Haferkamp (2007) demostró la relevancia de las proteínas AACs en el cultivo de la patata tras producir una ligera reducción de los transcritos de AAC y observar una fuerte disminución en la producción del tubérculo.

En la figura 15 se representa la implicación de algunas de las proteínas identificadas en la ruta de la biosíntesis de las oxilipinas. La cadena de transporte de electrones que genera el ATP transportado por las AACs es la principal fuente de ROS como el caso del superóxido (O_2^-) y el H_2O_2 (Huang *et al.*, 2016). La superóxido dismutasa es la enzima encargada de la transformación del O_2^- en H_2O_2 y su expresión es constante durante la etapa de dormancia (Bajji *et al.*, 2007a). El H_2O_2 , debido a su importancia para el tubérculo es una de las ROS más estudiados en la bibliografía. Aunque el H_2O_2 puede ser dañino para la célula se conoce que desempeña actividades asociadas con la señalización y el desarrollo de la planta (Bajji *et al.*, 2007a; Bhattacharjee, 2012). Para evitar los posibles daños celulares causado por H_2O_2 la enzima CAT es la encargada de la conversión de H_2O_2 a $H_2O + O_2$. Interesantemente, la enzima CAT es una de las proteínas identificadas que se encuentra con una mayor cantidad en Ágata en comparación con Kennebec ($RC = -0,391$). De esta manera, la variedades con una gran abundancia potencial de las ROS debido a una mayor cantidad de AACs, también muestran un aumento en la expresión de CATs para hacer frente al daño oxidativo. Además del H_2O , la reacción de la CAT da como producto O_2 , una ROS que posee una mayor capacidad de migración y capacidad de formar endoperóxidos o hidroperóxidos (Montillet *et al.*, 2004; Bhattacharjee, 2012). El O_2 es el sustrato de la familia enzimática de las LOXs para producir la oxidación de PUFAS y sintetizar la familia de las oxilipinas (Kolomiets *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2017). Existe una gran variedad de oxilipinas que están involucradas en la regulación del crecimiento del tubérculo como es el caso del jasmonato. Además, Kolomiets *et al.* (2001) consiguieron reflejar la importancia de esta reacción mediante la eliminación del gen *Lox1*, dando como resultado una reducción en la productividad de los tubérculos y la aparición de una morfología anormal en los mismos.

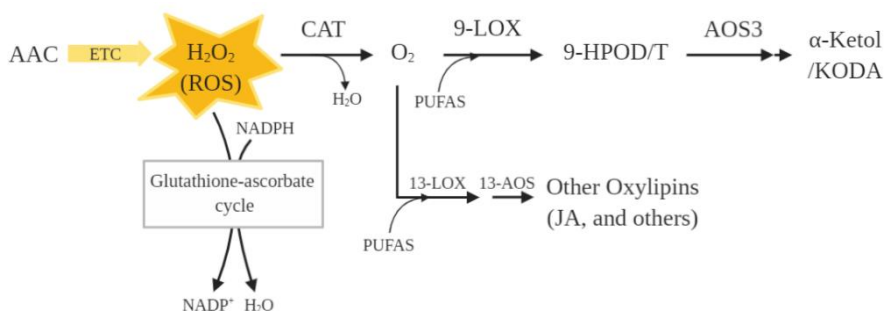


Figure 15. Synthetic scheme of the role of proteins in the potato tuber in the state of endodormancy with different abundances that lead to the biochemical pathway of the oxylipins.

La actividad enzimática de la familia de las LOXs que predomina en los tubérculos de patata es la producida por la 9-LOX (Royo *et al.*, 1996). Específicamente, esta enzima fue la proteína identificada en nuestro estudio y en una mayor cantidad en las variedades con una dormancia relativa más corta dentro de las comparaciones entre pares ($RC = -0,097$; $RC = -0,167$; $RC = -0,070$ entre Ágata y Kennebec, Ágata y Agria y Kennebec y Agria, respectivamente). El producto de esta enzima 9-LOX es la oxilipina 9-HPODE, un sustrato altamente específico de la enzima aleno óxido sintasa 3 (AOS3). El principal producto de esta reacción en cadena en el tubérculo de patata es el compuesto α -ketol (Stumpe *et al.*, 2006). Morcillo *et al.* (2016) encontraron que la supresión del ARN de la enzima AOS3 no solo causaba una disminución en los niveles de α -ketol, sino que también triplicaba la cantidad de 9-HPODE. El α -ketol también ha sido denominado como KODA en otras especies y se ha especulado que podría estar jugando un papel clave en la regulación del crecimiento del tubérculo (Kolomiets *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2010; Haque *et al.*, 2016). Esta suposición es tentadora ya que los lípidos de almacenamiento oxigenados no solo aumentan durante la germinación, sino que también se escinden preferencialmente iniciando la

movilización de los lípidos de almacenamiento (Feussner *et al.*, 1995). Además, algunos estudios revelaron que en el tubérculo de la patata la expresión de α -ketol fue cinco veces más alta en los ojos de germinación que cualquier otra oxilipina (Stumpe *et al.*, 2006). Sakamoto *et al.* (2010) mostraron que el α -ketol promueve la ruptura de la endodormancia en los brotes de la flor de la pera japonesa (*Pyrus pyrifolia Nakai*). Y por último, se conoce que el α -ketol altera la fisiología de la semilla y que, los tratamientos con α -ketol en trigo provocaron una mayor germinación de la semilla incluso en condiciones de sequía (Haque *et al.*, 2016).

4.3.5 Interruptor de liberación de la dormancia

Este estudio se ha llevado a cabo en tubérculos endodormantes recién cosechados por lo que se espera una gran actividad de la CAT que catalizará predominantemente el H_2O_2 mientras se encuentre activa (Campbell *et al.*, 2008). Sin embargo, a medida que va finalizando el período de dormancia se inhiben las isoenzimas de CAT y es la ruta del glutatión-ascorbato la responsable de la eliminación del H_2O_2 (Campbell *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2014; Tuzet *et al.*, 2019). El aumento de H_2O_2 debido a la disminución de la actividad de CAT se ha relacionado con la brotación de los tubérculos de patata (M'Hamdi *et al.*, 2009). El aumento de H_2O_2 ha sido correlacionado con la salida de la dormancia. Al aplicar tiourea al 1% (inhibidor de CAT) y / o aplicar H_2O_2 se observó cómo se producía la liberación de la dormancia del tubérculo y el aumento del número de tallos (Bajji *et al.*, 2007a; Germchi *et al.*, 2011). Esto se debe a que la disminución de CAT provoca una acumulación de H_2O_2 , la cual es una molécula de señalización que produce una variedad de respuestas celulares (Mhamdi *et al.*, 2010; Bhattacharjee, 2012). En el cultivo de la patata, el aumento en H_2O_2 se ha correlacionado con genes de la activación de biosíntesis de giberelinas que juegan un papel importante en la activación y

elongación de brotes (Suttle, 2004; Kloosterman *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2011; Haider *et al.*, 2019). En otros cultivos como es en el caso de la cebada se observó que el aumento de H_2O_2 provoca una reducción del ácido abscísico. En la patata el ácido abscísico se encuentra asociado con la dormancia del tubérculo y se ha comprobado como sus niveles disminuyen gradualmente hasta la germinación (Wang *et al.*, 1995; Mani *et al.*, 2014). Sin embargo, altas dosis de tiourea o H_2O_2 no causan una mejora en la de brotación de tubérculos de patata y tampoco un aumento del número de tallos (Essid *et al.*, 2014). Esto podría deberse a que una fuerte inhibición de la CAT, cesando su producción de O_2 utilizado por las LOXs para la generación de la familia de las oxilipinas. Por este motivo, ni α -ketol estará disponible en los ojos de la germinación del tubérculo ni se sintetizará el jasmonato. De esta manera, el estadio de endodormancia corresponde con el periodo en que CAT y LOX están activas, provocando la movilización de lípidos y la generación de oxilipinas. Posteriormente, el período de tiempo que tarda la proteína CAT en ser inhibida corresponderá a la etapa de paradormancia, donde ocurre la cascada de señalización de brotación debido al aumento de H_2O_2 .





CONCLUSIONES



5 CONCLUSIONES

1. El estudio de revisión bibliográfica conduce a concluir que la electroforesis bidimensional (2-DE) es una herramienta proteómica especialmente útil para profundizar en el conocimiento de la biología de las proteínas de reserva, al tratarse de proteínas abundantes y con una masa molecular y punto isoelectrico dentro de sus límites de resolución. En particular, la aplicación de los protocolos de la 2-DE optimizados para la obtención de perfiles de alta resolución de las proteínas de reserva acoplados a la espectrometría de masas (MS), ha permitido avanzar significativamente en la identificación de las múltiples isoformas de las proteínas de reserva y modificaciones postraduccionales (fosforilaciones), así como, en sus cambios cualitativos y cuantitativos relacionados con el desarrollo y germinación de las semillas.
2. Los avances en la biología de las semillas debidos al uso de los mapas de referencia de las proteínas de reserva basados en la 2-DE acoplada a la MS, han proporcionado información de relevancia para la mejora de las semillas en una diversidad de caracteres como la calidad proteica, longevidad, contenido de gluten y respuesta al estrés, hongos, bacterias o insectos. No obstante, el uso combinado de las estrategias proteómicas basadas en gel y las denominadas *gel-free* (o *shotgun*) será probablemente necesario para conocer con mayor profundidad las redes de proteínas que regulan las actividades, funciones e interacciones de las proteínas de reserva a lo largo del ciclo de vida de las semillas.

3. El análisis realizado en el presente trabajo sobre la variación de las isoformas de la principal proteína de reserva del tubérculo, la patatina, en 15 variedades comerciales de patata mediante la 2-DE de alta resolución, mostró que los perfiles bidimensionales son cualitativamente específicos para cada una de las variedades. Por tanto, la variabilidad de las isoformas de la patatina es un marcador óptimo para la autenticación y trazabilidad de las variedades de patata.
4. Las distancias proteómicas entre las 15 variedades comerciales de patata, estimadas a partir de la variabilidad de las isoformas de patatina en perfiles bidimensionales, mostraron asociación ($P < 0,05$) con sus diferencias en el contenido de ceniza, materia seca y aminoácidos esenciales, parámetros que influyen en la calidad del tubérculo. Las distancias proteómicas permitieron también identificar variedades atípicas en lo que respecta al contenido de materia seca y al contenido y calidad de la proteína del tubérculo. Además, los resultados indican que las distancias proteómicas entre variedades son un buen indicador del grado de diferenciación genética entre cultivos.
5. El estudio de la diferenciación proteómica entre las 15 variedades comerciales de patata basado en las isoformas de la patatina y su asociación con caracteres de calidad del tubérculo, sugiere que las distancias proteómicas podrían ser un marcador de utilidad para acelerar los procesos de cribado y selección de variedades de mayor calidad en los programas de mejora genética.
6. La caracterización del proteoma global de tubérculos endodormantes en tres variedades de patata con diferente longitud del periodo de dormancia (corta, media y media-larga), mediante la 2-DE junto con LC-Triple-TOF/MS, reveló cambios en abundancia

proteica ($P < 0,05$) entre cultivares para un total de 8 proteínas no redundantes (11 proteínas/isoformas) funcionalmente diversas.

7. Las proteínas identificadas, con abundancia diferencial entre cultivares, intervienen en el desarrollo y la brotación del tubérculo y podrían jugar un papel clave en la duración de la dormancia. El análisis de la función de las proteínas identificadas sugiere que algunas de ellas participan en la ruta bioquímica de la síntesis de oxilipinas. La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), a través de la reducción de ROS por catalasas, permite la síntesis y acumulación en los ojos del tubérculo de las oxilipinas como el α -ketol. La acumulación de α -ketol podría favorecer la brotación del tubérculo cuando se produce la inhibición de la reducción de ROS.
8. Este primer estudio sobre los cambios proteómicos en variedades con diferente longitud del periodo de dormancia sugiere proteínas candidatas que intervienen en la longitud de la dormancia y abre el camino a estudios futuros encaminados a dilucidar el subproteoma total y los mecanismos moleculares implicados en este periodo del desarrollo del tubérculo de patata de gran importancia biológica y comercial.





BIBLIOGRAFÍA



6 BIBLIOGRAFÍA

- Acharjee, A., Chibon, P.-Y., Kloosterman, B., America, T., Renaut, J., Maliepaard, C. and Visser, R. G. F. (2018) 'Genetical genomics of quality related traits in potato tubers using proteomics', *BMC Plant Biology*, 18(1). doi: 10.1186/s12870-018-1229-1.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A. A. and Komatsu, S. (2008) 'Proteome analysis of potato under salt stress', *Journal of Proteome Research*, 7(11). doi: 10.1021/pr800460y.
- Agrawal, G. K. and Thelen, J. J. (2005) 'Development of a simplified, economical polyacrylamide gel staining protocol for phosphoproteins', *Proteomics*, 5(18). doi: 10.1002/pmic.200500021.
- Agrawal, G. K. and Thelen, J. J. (2006) 'Large scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape', *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(11). doi: 10.1074/mcp.m600084-mcp200.
- Agrawal, L., Chakraborty, S., Jaiswal, D. K., Gupta, S., Datta, A. and Chakraborty, N. (2008) 'Comparative proteomics of tuber induction, development and maturation reveal the complexity of tuberization process in potato (*Solanum tuberosum* L.)', *Journal of Proteome Research*, 7(9). doi: 10.1021/pr8000755.
- AHDB (2017) 'Agriculture and Horticulture Development Board', [Ahdb.org.uk](http://varieties.ahdb.org.uk/). Available at: <http://varieties.ahdb.org.uk/>.
- Aksenova, N. P., Sergeeva, L. I., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Kolachevskaya, O. O. and Romanov, G. A. (2013) 'Regulation of potato tuber dormancy and sprouting', *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(3). doi: 10.1134/s1021443713030023.

- Alexopoulos, A. A., Aivalakis, G., Akoumianakis, K. A. and Passam, H. C. (2009) 'Bromoethane induces dormancy breakage and metabolic changes in tubers derived from true potato seed', *Postharvest Biology and Technology*, 54(3). doi: 10.1016/j.postharvbio.2009.07.004.
- Alexopoulos, A. A., Akoumianakis, K. A., Vemmos, S. N. and Passam, H. C. (2007) 'The effect of postharvest application of gibberellic acid and benzyl adenine on the duration of dormancy of potatoes produced by plants grown from TPS', *Postharvest Biology and Technology*, 46(1). doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.03.016.
- Álvarez, S., Álvarez, O., Expido, J., García, L., Prol, F. (2005). 'Implantación de protocolos de evaluación de la calidad de la patata para consumo', *III Congreso Nacional de Agroingeniería*.
- Amado, I. R., Franco, D., Sánchez, M., Zapata, C. and Vázquez, J. A. (2014). 'Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology'. *Food Chemistry*, 165. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.05.103.
- Aminedi, R. and Das, N. (2014) 'Class I patatin genes from potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars: molecular cloning, sequence comparison, prediction of diverse cis-regulatory motifs, and assessment of the promoter activities under field and in vitro conditions', *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 50(6). doi: 10.1007/s11627-014-9631-3.
- Andrews, D. L., Beames, B., Summers, M. D. and Park, W. D. (1988) 'Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector', *Biochemical Journal*, 252(1). doi: 10.1042/bj2520199.
- Bachem, C., van der Hoeven, R., Lucker, J., Oomen, R., Casarini, E., Jacobsen, E. and Visser, R. (2000) 'Functional genomic analysis of potato tuber life-cycle', *Potato Research*, 43(4). doi: 10.1007/bf02360536.

- Badenoch-Jones, J., Spencer, D., Higgins, T. J. V. and Millerd, A. (1981) 'The role of glycosylation in storage-protein synthesis in developing pea seeds', *Planta*, 153(3). doi: 10.1007/bf00383888.
- Baginsky, S. (2009) 'Plant proteomics: Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation', *Mass Spectrometry Reviews*, 28(1). doi: 10.1002/mas.20183.
- Bajji, M., M'Hamdi, M., Gastiny, F., Delaplace, P., Fauconnier, M.-L. and du Jardin, P. (2007b) 'Catalase inhibition alters suberization and wound healing in potato (*Solanum tuberosum*) tubers', *Physiologia Plantarum*, 129(3). doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00844.x.
- Bajji, M., M'Hamdi, M., Gastiny, F., Rojas-Beltran, J. A. and du Jardin, P. (2007a) 'Catalase inhibition accelerates dormancy release and sprouting in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers', *Biotechnololy, Agronomy, Society and Environment*, 11(2).
- Barbier-Brygoo, H. and Joyard, J. (2004) 'Focus on plant proteomics', *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(12). doi: 10.1016/j.plaphy.2004.10.012.
- Bárta, J. and Bártová, V. (2008) 'Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes', *Czech Journal of Food Sciences*, 26(5). doi: 10.17221/27/2008-cjfs.
- Bárta, J., Bártová, V., Zdráhal, Z. and Šedo, O. (2012) 'Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: Table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17). doi: 10.1021/jf3003448.
- Bártová, V. and Bárta, J. (2009) 'Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19). doi: 10.1021/jf900897b.
- Bártová, V., Bárta, J. and Jarošová, M. (2019) 'Antifungal and

- antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(14). doi: 10.1007/s00253-019-09887-9.
- Bártová, V., Bárta, J., Brabcová, A., Zdráhal, Z. and Horáčková, V. (2015) 'Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species', *Journal of Food Composition and Analysis*, 40. doi: 10.1016/j.jfca.2014.12.006.
- Basha, S. M. M. and Beevers, L. (1976) 'Glycoprotein metabolism in the cotyledons of *pisum sativum* during development and germination', *Plant Physiology*, 57(1). doi: 10.1104/pp.57.1.93.
- Basiak, E., Lenart, A. and Debeaufort, F. (2017) 'Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films', *International Journal of Biological Macromolecules*, 98. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.122.
- Bauw, G., Nielsen, H. V., Emmersen, J., Nielsen, K. L., Jorgensen, M. and Welinder, K. G. (2006) 'Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras', *FEBS Journal*, 273(15). doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05364.x.
- Berdugo-Cely, J., Valbuena, R. I., Sánchez-Betancourt, E., Barrero, L. S. and Yockteng, R. (2017) 'Genetic diversity and association mapping in the colombian central collection of *Solanum tuberosum* L. Andigenum group using SNPs markers', *PLOS ONE*. Edited by X.-Q. Li, 12(3). doi: 10.1371/journal.pone.0173039.
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S. and Masle, J. (2008) 'Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*', *The Plant Cell Online*, 20(12). doi: 10.1105/tpc.108.061010.
- Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D., Bravo, S., García, L., Zapata, C. (2017) 'Identification and mapping of phosphorylated isoforms of the major storage protein of potato based on two-dimensional electrophoresis', in *Advances in Seed Biology*. IntechOpen - Rijeka.

- Bernal, J., Mouzo, D., López-Pedrouso, M., García, L., Franco, D., Zapata, C. (2019) 'The major storage protein in potato tuber is mobilized by a mechanism dependent on its phosphorylation status', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). doi: 10.3390/ijms20081889.
- Bewley, J. D. and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. 2nd edn. Plenum Press - New York.
- Bhattacharjee, S. (2012) 'The language of reactive oxygen species signaling in plants', *Journal of Botany*. doi: 10.1155/2012/985298.
- Bianchi, G., Scalzo, R. L., Testoni, A. and Maestrelli, A. (2014) 'Nondestructive analysis to monitor potato quality during cold storage', *Journal of Food Quality*, 37(1). doi: 10.1111/jfq.12068.
- Bisognin, D. A., Manrique-Carpintero, N. C. and Douches, D. S. (2018) 'QTL analysis of tuber dormancy and sprouting in potato', *American Journal of Potato Research*, 95(4). doi: 10.1007/s12230-018-9638-0.
- Blackstock, W. P. and Weir, M. P. (1999) 'Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins', *Trends in Biotechnology*, 17(3). doi: 10.1016/s0167-7799(98)01245-1.
- Blenkinsop, R. W., Copp, L. J., Yada, R. Y. and Marangoni, A. G. (2002) 'Changes in compositional parameters of tubers of potato (*Solanum tuberosum*) during low-temperature storage and their relationship to chip processing quality', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16). doi: 10.1021/jf0255984.
- Boehm, J. D., Nguyen, V., Tashiro, R. M., Anderson, D., Shi, C., Wu, X., Woodrow, L., Yu, K., Cui, Y. and Li, Z. (2017) 'Genetic mapping and validation of the loci controlling 7S α' and 11S A-type storage protein subunits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]', *Theoretical and Applied Genetics*, 131(3). doi: 10.1007/s00122-017-3027-9.
- Bogucki, S. and Nelson, D. C. (1980) 'Length of dormancy and sprouting characteristics of ten potato cultivars', *American Potato*

Journal, 57(4). doi: 10.1007/bf02853866.

Bollini, R., Vitale, A. and Chrispeels, M. J. (1983) 'In vivo and in vitro processing of seed reserve protein in the endoplasmic reticulum: evidence for two glycosylation steps', *The Journal of Cell Biology*, 96(4). doi: 10.1083/jcb.96.4.999.

Bommer, U.-A. and Thiele, B.-J. (2004) 'The translationally controlled tumour protein (TCTP)', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(3). doi: 10.1016/s1357-2725(03)00213-9.

Borisjuk, L., Neuberger, T., Schwender, J., Heinzl, N., Sunderhaus, S., Fuchs, J., Hay, J. O., Tschiersch, H., Braun, H.-P., Denolf, P. *et al.* (2013) 'Seed architecture shapes embryo metabolism in oilseed rape', *The Plant Cell*, 25(5). doi: 10.1105/tpc.113.111740.

Bornet, B., Goraguer, F., Joly, G. and Branchard, M. (2002) 'Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs)', *Genome*, 45(3). doi: 10.1139/g02-002.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1-2). doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Bündig, C., Jozefowicz, A. M., Mock, H.-P. and Winkelmann, T. (2016). 'Proteomic analysis of two divergently responding potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) following osmotic stress treatment in vitro'. *Journal of Proteomics*, 143. doi: 10.1016/j.jprot.2016.04.048.

Burlingame, B., Mouillé, B. and Charrondière, R. (2009) 'Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes', *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(6). doi: 10.1016/j.jfca.2009.09.001.

Burton, W. G. (1989) *The potato*. 3rd edn. Longman - New York.

- Calliope, S. R., Lobo, M. O. and Sammán, N. C. (2018) 'Biodiversity of Andean potatoes: Morphological, nutritional and functional characterization', *Food Chemistry*, 238. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.074.
- Camire, M. E., Kubow, S. and Donnelly, D. J. (2009) 'Potatoes and human health', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(10). doi: 10.1080/10408390903041996.
- Campbell, M. (2015) 'Chemical release of endodormancy in potato involves multiple mechanisms', in *Advances in plant dormancy*. Springer - Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-14451-1_16.
- Campbell, M. A., Gleichsner, A., Alsbury, R., Horvath, D. and Suttle, J. (2010) 'The sprout inhibitors chlorpropham and 1,4-dimethylnaphthalene elicit different transcriptional profiles and do not suppress growth through a prolongation of the dormant state', *Plant Molecular Biology*, 73(1–2). doi: 10.1007/s11103-010-9607-6.
- Campbell, M., Segear, E., Beers, L., Knauber, D. and Suttle, J. (2008) 'Dormancy in potato tuber meristems: chemically induced cessation in dormancy matches the natural process based on transcript profiles', *Functional & Integrative Genomics*, 8(4). doi: 10.1007/s10142-008-0079-6.
- Cánovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H.-P. and Rossignol, M. (2004) 'Plant proteome analysis', *Proteomics*, 4(2). doi: 10.1002/pmic.200300602.
- Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. and Panis, B. (2005) 'Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis', *Proteomics*, 5(10). doi: 10.1002/pmic.200401222.
- Cavazos, A. and Gonzalez de Mejia, E. (2013) 'identification of bioactive peptides from cereal storage proteins and their potential role in prevention of chronic diseases', *Comprehensive Reviews in*

- Food Science and Food Safety*, 12(4). doi: 10.1111/1541-4337.12017.
- Chang, Y.-W., Alli, I., Konishi, Y. and Ziomek, E. (2011) 'Characterization of protein fractions from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and oat (*Avena sativa* L.) seeds using proteomic techniques', *Food Research International*. doi: 10.1016/j.foodres.2011.08.001.
- Chen, S. and Harmon, A. C. (2006) 'Advances in plant proteomics', *Proteomics*, 6(20). doi: 10.1002/pmic.200600143.
- Chevalier, F. (2010) 'Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics', *Proteome Science*, 8(1). doi: 10.1186/1477-5956-8-23.
- Chibani, K., Ali-Rachedi, S., Job, C., Job, D., Jullien, M. and Grappin, P. (2006) 'Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 142(4). doi: 10.1104/pp.106.087452.
- Chrispeels, M. J., Higgins, T. J., Craig, S. and Spencer, D. (1982) 'Role of the endoplasmic reticulum in the synthesis of reserve proteins and the kinetics of their transport to protein bodies in developing pea cotyledons.', *The Journal of Cell Biology*, 93(1). doi: 10.1083/jcb.93.1.5.
- CIP (2020) 'Potato', International Potato Center. Available at: <https://cipotato.org/>.
- Clasen, B. M., Stoddard, T. J., Luo, S., Demorest, Z. L., Li, J., Cedrone, F., Tibebu, R., Davison, S., Ray, E. E., Daulhac, A. *et al.* (2015) 'Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout', *Plant Biotechnology Journal*, 14(1). doi: 10.1111/pbi.12370.
- Collins, R. M., Afzal, M., Ward, D. A., Prescott, M. C., Sait, S. M., Rees, H. H. and Tomsett, A. B. (2010) 'Differential proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* genotypes exhibiting resistance or susceptibility to the insect herbivore, *Plutella xylostella*', *PLoS ONE*, 5(4). doi: 10.1371/journal.pone.0010103.

- Consoli, L. and Damerval, C. (2001) 'Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: Genetic variability in 45 maize inbred lines', *Electrophoresis*, 22(14). doi: 10.1002/1522-2683(200108)22:14<2983::aid-elps2983>3.0.co;2-#.
- Cools, K., Alamar, M. and Terry, L. A. (2014) 'Controlling sprouting in potato tubers using ultraviolet-C irradiance', *Postharvest Biology and Technology*, 98. doi: 10.1016/j.postharvbio.2014.07.005.
- D'Amico, L., Valsasina, B., Daminati, M. G., Fabbri, M. S., Nitti, G., Bollini, R., Ceriotti, A. and Vitale, A. (1992) 'Bean homologs of the mammalian glucose-regulated proteins: induction by tunicamycin and interaction with newly synthesized seed storage proteins in the endoplasmic reticulum', *The Plant Journal*, 2(4). doi: 10.1111/j.1365-3113.1992.00443.x.
- D'Amico, L., Valsasina, B., Daminati, M. G., Fabbri, M. S., Nitti, G., Bollini, R., Ceriotti, A. and Vitale, A. (2013) 'Combined N-glycome and N-glycoproteome analysis of the *Lotus japonicus* seed globulin fraction shows conservation of protein structure and glycosylation in legumes', *Journal of Proteome Research*, 12(7). doi: 10.1021/pr400224s.
- Dam, S., Thaysen-Andersen, M., Stenkjær, E., Lorentzen, A., Roepstorff, P., Packer, N. H. and Stougaard, J. (2013). 'Combined N-Glycome and N-Glycoproteome analysis of the *Lotus japonicus* seed globulin fraction shows conservation of protein structure and glycosylation in legumes. *Journal of Proteome Research*, 12(7). doi: 10.1021/pr400224s.
- Davies, H. V., Shepherd, L. V. T., Burrell, M. M., Carrari, F., Urbanczyk-Wochniak, E., Leisse, A., Hancock, R. D., Taylor, M., Viola, R., Ross, H. *et al.* (2005) 'Modulation of fructokinase activity of potato (*Solanum tuberosum*) results in substantial shifts in tuber metabolism', *Plant and Cell Physiology*, 46(7). doi: 10.1093/pcp/pci123.

- de Galarreta, J. I. R., Barandalla, L., Rios, D. J., Lopez, R. and Ritter, E. (2011) 'Genetic relationships among local potato cultivars from Spain using SSR markers', *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(3). doi: 10.1007/s10722-010-9583-3.
- de la Fuente, M., Borrajo, A., Bermúdez, J., Lores, M., Alonso, J., López, M., Santalla, M., de Ron, A. M., Zapata, C. and Alvarez, G. (2011) '2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds', *Journal of Proteomics*, 74(2). doi: 10.1016/j.jprot.2010.10.004.
- de la Fuente, M., López-Pedrouso, M., Alonso, J., Santalla, M., de Ron, A. M., Alvarez, G., Zapata, C. (2012) 'In-Depth characterization of the phaseolin protein diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry', *Food Technology and Biotechnology*, 50(3).
- de Souza Cândido, E., Pinto, M. F. S., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., Grossi-de-Sá, M. F. and Franco, O. L. (2011) 'Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms', *The FASEB Journal*, 25(10). doi: 10.1096/fj.11-184291.
- Delaplace, P., Fauconnier, M.-L., Sergeant, K., Dierick, J.-F., Oufir, M., van der Wal, F., America, A. H. P., Renaut, J., Hausman, J.-F. and du Jardin, P. (2009) 'Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber ageing induces changes in the proteome and antioxidants associated with the sprouting pattern', *Journal of Experimental Botany*, 60(4). doi: 10.1093/jxb/erp008.
- Destefano-Beltran, L., Knauber, D., Huckle, L. and Suttle, J. (2006) 'Chemically forced dormancy termination mimics natural dormancy progression in potato tuber meristems by reducing ABA content and modifying expression of genes involved in regulating ABA synthesis and metabolism', *Journal of Experimental Botany*, 57(11). doi: 10.1093/jxb/erl050.
- Dobiesz, M., Piotrowicz-Cieślak, A. I. and Michalczyk, D. J. (2017) 'Physiological and biochemical parameters of lupin seed subjected

- to 29 years of storage', *Crop Science*, 57(4). doi: 10.2135/cropsci2016.08.0663.
- Dong, K., Zhen, S., Cheng, Z., Cao, H., Ge, P. and Yan, Y. (2015) 'Proteomic analysis reveals key proteins and phosphoproteins upon seed germination of wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Frontiers in Plant Science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.01017.
- Dowsey, A. W., Morris, J. S., Gutstein, H. B. and Yang, G.-Z. (2009) 'Informatics and statistics for analyzing 2-D gel electrophoresis images', *Methods in Molecular Biology*, 604. doi: 10.1007/978-1-60761-444-9_16.
- Duranti, M., Gius, C., Sessa, F. and Vecchio, G. (1995b) 'The saccharide chain of lupin seed conglutin gamma is not responsible for the protection of the native protein from degradation by trypsin, but facilitates the refolding of the acid-treated protein to the resistant conformation', *European Journal of Biochemistry*, 230(3). doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20632.x.
- Duranti, M., Guerrieri, N., Takahashi, T. and Cerletti, P. (1988) 'The legumin-like storage protein of *Lupinus albus* seeds', *Phytochemistry*, 27(1). doi: 10.1016/0031-9422(88)80586-7.
- Duranti, M., Horstmann, C., Gilroy, J. and Croy, R. R. D. (1995a) 'The molecular basis for N-glycosylation in the 11S globulin (legumin) of lupin seed', *Journal of Protein Chemistry*, 14(2). doi: 10.1007/bf01888368.
- Duranti, M., Scarafoni, A., Gius, C., Negri, A. and Faoro, F. (1994) 'Heat-induced synthesis and tunicamycin-sensitive secretion of the putative storage glycoprotein conglutin gamma from mature lupin seeds', *European Journal of Biochemistry*, 222(2). doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18877.x.
- Dutt, S., Manjul, A.S., Raigond, P., Singh, B., Siddappa, S., Bhardwaj, V., Kawar, P. G., Patil, V. U. and Kardile, H. B. (2017) 'Key players associated with tuberization in potato: potential candidates for genetic engineering', *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7).

doi: 10.1080/07388551.2016.1274876.

Eaton-Mordas, C. A. and Moore, K. G. (1978) 'Seed glycoproteins of *Lupinus angustifolius*', *Phytochemistry*, 17(4). doi: 10.1016/s0031-9422(00)94195-5.

ECPD (2020) 'The European Cultivated Potato Database', Europotato.org. Available at: <https://www.europotato.org/>.

Elfalleh, W., Nasri, N., Sarraï, N., Guasmi, F., Triki, T., Marzougui, N. and Ferchichi, A. (2010) 'Storage protein contents and morphological characters of some Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars', *Acta Botanica Gallica*, 157(3). doi: 10.1080/12538078.2010.10516217.

El-Shemy, H. A., Khalafalla, M. M., Fujita, K. and Ishimoto, M. (2007) 'Improvement of protein quality in transgenic soybean plants', *Biologia Plantarum*, 51(2). doi: 10.1007/s10535-007-0055-3.

Ericson, M. C. and Chrispeels, M. J. (1973) 'Isolation and characterization of glucosamine-containing storage glycoproteins from the cotyledons of *Phaseolus aureus*', *Plant Physiology*, 52(2). doi: 10.1104/pp.52.2.98.

Eshel, D. (2015) 'Bridging dormancy release and apical dominance in potato tuber', in *Advances in plant dormancy*. Springer - New York.

Essid, M. F., M'Hamdi M., Chikh-Rouhou, H., Abid, G., Ben Khedher, M. (2014) 'Hydrogen peroxide and catalase as a way to break dormancy of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)', *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(15).

Facchiano, A. M., Colonna, G., Chiosi, E., Illiano, G., Spina, A., Lafiandra, D. and Buonocore, F. (1999) 'In vitro phosphorylation of high molecular weight glutenin subunits from wheat endosperm', *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(12). doi: 10.1016/s0981-9428(99)00103-5.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization (FAO)/ World Health

- Organization (WHO) (1991) Expert Consultation. Protein Quality Evaluation. Nutrition Meetings.
- FAOSTAT (2019) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Fauconnier, M.-L., Rojas-Beltrán, J., Delcarte, J., Dejaeghere, F., Marlier, M. and Jardin, P. (2002) 'Lipoxygenase pathway and membrane permeability and composition during storage of potato tubers (*Solanum tuberosum* L. cv Bintje and Désirée) in different conditions', *Plant Biology*, 4(1). doi: 10.1055/s-2002-20439.
- Faurobert, M., Pelpoir, E. and Chaïb, J. (2007) 'Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues', *Plant Proteomics*, 355. doi: 10.1385/1-59745-227-0:9.
- Favoretto, P., Veasey, E. A. and Melo, P. C. T. (2011) 'Molecular characterization of potato cultivars using SSR markers', *Horticultura Brasileira*, 29(4). doi: 10.1590/s0102-05362011000400017.
- FDA/HHS. Food and Drug Administration (FDA)/Department of Health and Human Services (HHS) (1993) 'Food labeling: mandatory status of nutrition labeling and nutrient content revision, format for nutrition label', Federal Register, 58.
- Fernández, M. B., Pagano, M. R., Daleo, G. R. and Guevara, M. G. (2012) 'Hydrophobic proteins secreted into the apoplast may contribute to resistance against *Phytophthora infestans* in potato', *Plant Physiology and Biochemistry*, 60. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.07.017.
- Ferranti, P., Mamone, G., Picariello, G. and Addeo, F. (2007) 'Mass spectrometry analysis of gliadins in celiac disease', *Journal of Mass Spectrometry*, 42(12). doi: 10.1002/jms.1361.
- Feussner, I., Wasternack, C., Kindl, H. and Kuhn, H. (1995) 'Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(25). doi:

10.1073/pnas.92.25.11849.

- Flores, T., Alape-Girón, A., Flores-Díaz, M. and Flores, H. E. (2002) 'Ocatin. A novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities', *Plant Physiology*, 128(4). doi: 10.1104/pp.010541.
- Foukaraki, S. G., Cools, K., Chope, G. A. and Terry, L. A. (2016) 'Impact of ethylene and 1-MCP on sprouting and sugar accumulation in stored potatoes', *Postharvest Biology and Technology*, 114. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.11.013.
- Franco, D. and Lorenzo, J. M. (2014) 'Effect of muscle and intensity of finishing diet on meat quality of foals slaughtered at 15 months', *Meat Science*, 96(1). doi: 10.1016/j.meatsci.2013.07.018.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J. M. and Zapata, C. (2015a) 'Quantification of proteome changes in bovine muscle from two-dimensional electrophoresis data', *Data in Brief*, 4. doi: 10.1016/j.dib.2015.04.011.
- Franco, D., Mato, A., Salgado, F. J., López-Pedrouso, M., Carrera, M., Bravo, S., Parrado, M., Gallardo, J. M. and Zapata, C. (2015b) 'Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress', *Journal of Proteomics*, 122. doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.029.
- Franco, D., Pateiro, M., Rodríguez Amado, I., López Pedrouso, M., Zapata, C., Vázquez, J. A. and Lorenzo, J. M. (2016) 'Antioxidant ability of potato (*Solanum tuberosum*) peel extracts to inhibit soybean oil oxidation', *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(12). doi: 10.1002/ejlt.201500419.
- Freyre, R., Warnke, S., Sosinski, B. and Douches, D. S. (1994) 'Quantitative trait locus analysis of tuber dormancy in diploid potato (*Solanum spp.*)', *Theoretical and Applied Genetics*, 89(4). doi: 10.1007/bf00225383.
- Friedman, M. and Brandon, D. L. (2001) 'Nutritional and health

- benefits of soy proteins', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3). doi: 10.1021/jf0009246.
- Friedman, M., Huang, V., Quiambao, Q., Noritake, S., Liu, J., Kwon, O., Chintalapati, S., Young, J., Levin, C. E., Tam, C. *et al.* (2018) 'Potato peels and their bioactive glycoalkaloids and phenolic compounds inhibit the growth of pathogenic trichomonads', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30). doi: 10.1021/acs.jafc.8b01726.
- Friso, G. and van Wijk, K. J. (2015) 'Update: Post-translational protein modifications in plant metabolism', *Plant Physiology*, 169. doi: 10.1104/pp.15.01378.
- Fukuda, T., Prak, K., Fujioka, M., Maruyama, N. and Utsumi, S. (2007) 'Physicochemical properties of native adzuki bean (*Vigna angularis*) 7S globulin and the molecular cloning of its cDNA isoforms', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9). doi: 10.1021/jf063205l.
- Gacek, K., Bartkowiak-Broda, I. and Batley, J. (2018) 'Genetic and molecular regulation of seed storage proteins (SSPs) to improve protein nutritional value of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seeds', *Frontiers in Plant Science*, 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00890.
- Gallardo, K., Firnhaber, C., Zuber, H., Hélicher, D., Belghazi, M., Henry, C., Küster, H. and Thompson, R. (2007) 'A combined proteome and transcriptome analysis of developing *Medicago truncatula* seeds: Evidence for metabolic specialization of maternal and filial tissues', *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(12). doi: 10.1074/mcp.M700171-MCP200.
- Ganal, M. W., Bonierbale, M. W., Roeder, M. S., Park, W. D. and Tanksley, S. D. (1991). 'Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato'. *Molecular and General Genetics*, 225(3). doi: 10.1007/BF00261693.
- García, L., Álvarez, S., Alvarez, O., Expido, J., Prol, F. (2005). 'Implantación de protocolos de evaluación de la calidad de la patata

para industria', *III Congreso Nacional de Agroingeniería*.

- García-Molina, M. D., Muccilli, V., Saletti, R., Foti, S., Masci, S. and Barro, F. (2017). 'Comparative proteomic analysis of two transgenic low-gliadin wheat lines and non-transgenic wheat control'. *Journal of Proteomics*, 165. doi: 10.1016/j.jprot.2017.06.010.
- Germchi, S., GhannadiBehrooz, F. and Badri, S. (2011) 'Effect of thiourea on dormancy breaking and yield of potato (*Solanum Tuberosum* L.) minitubers Marfona cv. in greenhouse', in International conference on environmental and agriculture engineering. IACSIT Press - Singapore.
- Ghatak, A., Chaturvedi, P. and Weckwerth, W. (2017) 'Cereal crop proteomics: Systemic analysis of crop drought stress responses towards marker-assisted selection breeding', *Frontiers in Plant Science*, 8(757). doi: 10.3389/fpls.2017.00757.
- Ghelis, T., Bolbach, G., Clodic, G., Habricot, Y., Miginiac, E., Sotta, B. and Jeannette, E. (2008) 'Protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases are involved in abscisic acid-dependent processes in arabidopsis seeds and suspension cells', *Plant Physiology*, 148(3). doi: 10.1104/pp.108.124594.
- Ghislain, M., Andrade, D., Rodríguez, F., Hijmans, R. J. and Spooner, D. M. (2006) 'Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja group using RAPDs and nuclear SSRs', *Theoretical and Applied Genetics*, 113(8). doi: 10.1007/s00122-006-0399-7.
- Gibbon, B. C., Wang, X. and Larkins, B. A. (2003) 'Altered starch structure is associated with endosperm modification in quality protein maize', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26). doi: 10.1073/pnas.2136854100.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M. and Rosahl, S. (2001) 'Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-

- treated potato cells', *Journal of Biological Chemistry*, 276(9). doi: 10.1074/jbc.m008606200.
- Gonzalez-Sanchez, M.-B., Lanucara, F., Helm, M. and Eysers, C. E. (2013) 'Attempting to rewrite history: challenges with the analysis of histidine-phosphorylated peptides', *Biochemical Society Transactions*, 41(4). doi: 10.1042/bst20130072.
- Görg, A., Drews, O., Lück, C., Weiland, F. and Weiss, W. (2009) '2-DE with IPGs', *Electrophoresis*, 30(S1). doi: 10.1002/elps.200900051.
- Görg, A., Lück, C. and Weiss, W. (2008). 'Sample prefractionation in granulated sephadex IEF gels'. *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-60327-064-9_22.
- Görg, A., Weiss, W. and Dunn, M. J. (2004) 'Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics', *Proteomics*, 4(12). doi: 10.1002/pmic.200401031.
- Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A. R., Vartanian, N. and Giraudat, J. (1999) 'ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling', *The Plant Cell Online*, 11(10). doi: 10.1105/tpc.11.10.1897.
- Granot, D., Kelly, G., Stein, O. and David-Schwartz, R. (2013) 'Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development', *Journal of Experimental Botany*, 65(3). doi: 10.1093/jxb/ert400.
- Graur, D. and Li, W.-H. (2000) Fundamentals of molecular evolution. 2nd edn. Sinauer Associates - Sunderland.
- Guo, G., L, D., Yan, X., Subburaj, S., Ge, P., Li, X., Hu, Y. and Yan, Y. (2012) 'Proteome characterization of developing grains in bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.)', *BMC Plant Biology*, 12(147). doi: 10.1186/1471-2229-12-147.
- Gupta, R., Min, C. W., Wang, Y., Kim, Y. C., Agrawal, G. K., Rakwal, R. and Kim, S. T. (2016) 'Expect the unexpected enrichment of

- “hidden proteome” of seeds and tubers by depletion of storage proteins’, *Frontiers in Plant Science*, 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00761.
- Gutiérrez-Galeano, D. F., Toscano-Morales, R., Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B. and Ruiz-Medrano, R. (2014) ‘Structural divergence of plant TCTPs’, *Frontiers in Plant Science*, 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00361.
- Haddad, M. A., Nabeel, B. H., Al-tabbal, J., Al-Fraihat, A. (2016) ‘Effect of different potassium nitrate levels on yield and quality of potato tubers Moawiya’, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 14(1).
- Haferkamp, I. (2007) ‘The diverse members of the mitochondrial carrier family in plants’, *FEBS Letters*, 581(12). doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.020.
- Haider, M. W., Ayyub, C. M., Malik, A., Ahmad, R. (2019) ‘Plant growth regulators and electric current break tuber dormancy by modulating antioxidant activities of potato’, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(4). doi: 10.21162/PAKJAS/19.7428.
- Hajheidari, M., Eivazi, A., Buchanan, B. B., Wong, J. H., Majidi, I. and Salekdeh, G. H. (2007) ‘Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat’, *Journal of Proteome Research*, 6(4). doi: 10.1021/pr060570j.
- Halford, N. G., Curtis, T. Y., Muttucumaru, N., Postles, J., Elmore, J. S. and Mottram, D. S. (2012) ‘The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue’, *Journal of Experimental Botany*, 63(8). doi: 10.1093/jxb/ers011.
- Hall, T. C., McLeester, R. C. and Bliss, F. A. (1977) ‘Equal expression of the maternal and paternal alleles for the polypeptide subunits of the major storage protein of the bean *Phaseolus vulgaris* L.’, *Plant Physiology*, 59(6). doi: 10.1104/pp.59.6.1122.
- Han, C. and Yang, P. (2016) ‘Two-dimensional gel electrophoresis-based plant phosphoproteomics’, *Phospho-Proteomics*, 1355. doi:

10.1007/978-1-4939-3049-4_14.

- Han, C., Wang, K. and Yang, P. (2014) 'Gel-based comparative phosphoproteomic analysis on rice embryo during germination', *Plant and Cell Physiology*, 55(8). doi: 10.1093/pcp/pcu060.
- Haque, E., Osmani, A. A., Ahmadi, S. H., Ogawa, S., Takagi, K., Yokoyama, M. and Ban, T. (2016) 'KODA, an α -ketol derivative of linolenic acid provides wide recovery ability of wheat against various abiotic stresses', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7. doi: 10.1016/j.bcab.2016.05.005.
- Hartmann, A., Senning, M., Hedden, P., Sonnewald, U. and Sonnewald, S. (2011) 'Reactivation of meristem activity and sprout growth in potato tubers require both cytokinin and gibberellin', *Plant Physiology*, 155(2). doi: 10.1104/pp.110.168252.
- He, D. and Yang, P. (2013) 'Proteomics of rice seed germination', 4(July). doi: 10.3389/fpls.2013.00246.
- He, Y., Wang, S. and Ding, Y. (2013) 'Identification of novel glutelin subunits and a comparison of glutelin composition between japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.)', *Journal of Cereal Science*, 57(3). doi: 10.1016/j.jcs.2012.12.009.
- Hedrick, P. W. (2005) Genetics of populations. 3rd edn. Jones And Bartlett Publishers - Boston.
- Heibges, A., Salamini, F. and Gebhardt, C. (2003) 'Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)', *Molecular Genetics and Genomics*, 269(4). doi: 10.1007/s00438-003-0861-z.
- Hou, J., Zhang, H., Liu, J., Reid, S., Liu, T., Xu, S., Tian, Z., Sonnewald, U., Song, B. and Xie, C. (2017) 'Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways', *Journal of Experimental Botany*, 68(9). doi: 10.1093/jxb/erx076.

- Huaman, Z. and Spooner, D. M. (2002) 'Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*)', *American Journal of Botany*, 89(6). doi: 10.3732/ajb.89.6.947.
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K. and Millar, A. H. (2016) 'The Roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants', *Plant Physiology*, 171(3). doi: 10.1104/pp.16.00166.
- Irar, S., Oliveira, E., Pagès, M. and Goday, A. (2006) 'Towards the identification of late-embryogenic-abundant phosphoproteome in *Arabidopsis* by 2-DE and MS', *Proteomics*, 6(S1). doi: 10.1002/pmic.200500387.
- Isherwood, F. A. (1973) 'Starch-sugar interconversion in *Solanum tuberosum*', *Phytochemistry*, 12(11). doi: 10.1016/0031-9422(73)85060-5.
- Jefferies, R. A. and Lawson, H. M. (1991). 'A key for the stages of development of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Applied Biology*, 119(2). doi: 10.1111/j.1744-7348.1991.tb04879.x
- Jiang, C., Cheng, Z., Zhang, C., Yu, T., Zhong, Q., Shen, J. Q. and Huang, X. (2014) 'Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of the *Oryza* genus', *Proteome Science*, 12(1). doi: 10.1186/s12953-014-0051-4.
- Jiang, M., Zhai, L., Yang, H., Zhai, S. and Zhai, C. (2016) 'Analysis of active components and proteomics of chinese wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz.) and *Indica* rice (*Nagina22*)', *Journal of Medicinal Food*, 19(8). doi: 10.1089/jmf.2015.3612.
- Jørgensen, M., Bauw, G. and Welinder, K. G. (2006) 'Molecular properties and activities of tuber proteins from starch potato cv. Kuras', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25). doi: 10.1021/jf0623945.
- Jørgensen, M., Stensballe, A. and Welinder, K. G. (2011) 'Extensive post-translational processing of potato tuber storage proteins and vacuolar targeting', *FEBS Journal*, 278(21). doi: 10.1111/j.1742-

4658.2011.08311.x.

- Jorrín, J. V, Maldonado, A. M. and Castillejo, M. A. (2007) 'Plant proteome analysis: A 2006 update', *Proteomics*, 7(16). doi: 10.1002/pmic.200700135.
- Joshi, J. Pandurangan, S., Diapari, M., Marsolais, F. (2017) 'Comparison of gene families: seed storage and other seed proteins', in *The common bean genome*. Springer International Publishing - Switzerland.
- Juan, H.-F. (2019) 'Proteomic techniques and their applications', in *Biomolecular and bioanalytical techniques: Theory, methodology and applications*. John Wiley & Sons - New Jersey.
- Kalemba, E. M. and Pukacka, S. (2014) 'Carbonylated proteins accumulated as vitality decreases during long-term storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds', *Trees*, 28(2). doi: 10.1007/s00468-013-0967-9.
- Kamnerdpetch, C., Weiss, M., Kasper, C. and Scheper, T. (2007) 'An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems', *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4). doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.05.006.
- Kärenlampi, S. O. and White, P. J. (2016) 'Potato proteins, lipids, and minerals', in *Advances in potato chemistry and technology*. 2nd edn. Academic Press - New Zealand. doi: 10.1016/b978-0-12-374349-7.00005-2.
- Kawaura, K., Miura, M., Kamei, Y., Ikeda, T.M. and Ogihara, Y. (2018). 'Molecular characterization of gliadins of Chinese Spring wheat in relation to celiac disease elicitors'. *Genes & Genetic Systems*, 93(1). doi: 10.1266/ggs.17-00034.
- Kersten, B., Agrawal, G.K., Durek, P., Neigenfind, J., Schulze, W., Walther, D. and Rakwal, R. (2009) 'Plant phosphoproteomics: An update', *Proteomics*, 9(4). doi: 10.1002/pmic.200800548.
- Kim, H. T., Choi, U.-K., Ryu, H. S., Lee, S. J. and Kwon, O.-S. (2011)

- ‘Mobilization of storage proteins in soybean seed (*Glycine max* L.) during germination and seedling growth’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(9). doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.004.
- Kim, H.-J., Lee, J.-Y., Yoon, U.-H., Lim, S.-H. and Kim, Y.-M. (2013) ‘Effects of reduced prolamin on seed storage protein composition and the nutritional quality of rice’, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8). doi: 10.3390/ijms140817073.
- Kim, S. G., Lee, J.-S., Shin, S.-H., Koo, S. C., Kim, J. T., Bae, H. H., Son, B.-Y., Kim, Y.-H., Kim, S. L., Baek, S.-B. *et al.* (2015) ‘Profiling of differentially expressed proteins in mature kernels of Korean waxy corn cultivars using proteomic analysis’, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58(3). doi: 10.1007/s13765-015-0047-5.
- Kim, Y.-S., Lee, Y.-H., Kim, H.-S., Kim, M.-S., Hahn, K.-W., Ko, J.-H., Joung, H. and Jeon, J.-H. (2008) ‘Development of patatin knockdown potato tubers using RNA interference (RNAi) technology, for the production of human-therapeutic glycoproteins’, *BMC Biotechnology*, 8(1). doi: 10.1186/1472-6750-8-36.
- Kirihara, J. A., Hunsperger, J. P., Mahoney, W. C. and Messing, J. W. (1988) ‘Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize’, *Molecular and General Genetics*, 211(3). doi: 10.1007/bf00425704.
- Klingenberg, M. (2008) ‘The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier’, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(10). doi: 10.1016/j.bbamem.2008.04.011.
- Kloosterman, B., Vorst, O., Hall, R. D., Visser, R. G. F. and Bachem, C. W. (2005) ‘Tuber on a chip: differential gene expression during potato tuber development’, *Plant Biotechnology Journal*, 3(5). doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00141.x.
- Kolarich, D. and Altmann, F. (2000) ‘N-glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of

- electrophoretically separated nonmammalian proteins: application to peanut allergen ara h 1 and olive pollen allergen ole e 1', *Analytical Biochemistry*, 285(1). doi: 10.1006/abio.2000.4737.
- Kolomiets, M. V., Hannapel, D. J., Chen, H., Tymeson, M. and Gladon, R. J. (2001) 'Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development', *The Plant Cell*, 13(3). doi: 10.1105/tpc.13.3.613.
- Koshiyama, I. (1966) 'Carbohydrate component in 7S protein of soybean casein fraction', *Agricultural and Biological Chemistry*, 30(7). doi: 10.1080/00021369.1966.10858660.
- Kovaleva, V., Cramer, R., Krynytskyy, H., Gout, I. and Gout, R. (2013) 'Analysis of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine-binding proteins in germinating seeds from Scots pine', *Plant Physiology and Biochemistry*, 67. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.008.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets', *Molecular Biology and Evolution*, 33(7). doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Kumari, N., Kofi, K. J., Grimbs, S., D'Souza, R. N., Kuhnert, N., Vrancken, G. and Ullrich, M. S. (2016) 'Biochemical fate of vicilin storage protein during fermentation and drying of cocoa beans', *Food Research International*, 90. doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.033.
- Kuyama, H., Toda, C., Watanabe, M., Tanaka, K. and Nishimura, O. (2003) 'An efficient chemical method for dephosphorylation of phosphopeptides', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(13). doi: 10.1002/rcm.1078.
- Lauer, I., Foetisch, K., Kolarich, D., Ballmer-Weber, B.K., Conti, A., Altmann, F., Vieths, S. and Scheurer, S. (2004) 'Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity', *Biochemical Journal*,

383(2). doi: 10.1042/bj20041062.

- Lehesranta, S. J., Davies, H. V., Shepherd, L. V. T., Koistinen, K. M., Massat, N., Nunan, N., McNicol, J. W. and Kärenlampi, S. O. (2006) 'Proteomic analysis of the potato tuber life cycle', *Proteomics*, 6(22). doi: 10.1002/pmic.200600383.
- Lehesranta, S. J., Davies, H. V., Shepherd, L. V. T., Nunan, N., McNicol, J. W., Auriola, S., Koistinen, K. M., Suomalainen, S., Kokko, H. I. and Kärenlampi, S. O. (2005) 'Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines', *Plant Physiology*, 138(3). doi: 10.1104/pp.105.060152.
- Leonel, M., do Carmo, E. L., Fernandes, A. M., Soratto, R. P., Ebúrneo, J. A. M., Garcia, É. L. and dos Santos, T. P. R. (2017) 'Chemical composition of potato tubers: the effect of cultivars and growth conditions', *Journal of Food Science and Technology*, 54(8). doi: 10.1007/s13197-017-2677-6.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.-C., Gomord, V. and Faye, L. (1998) 'N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends', *Plant Molecular Biology*, 38(1/2). doi: 10.1023/a:1006012005654.
- Lioi, L. and Bollini, R. (1984) 'Contribution of processing events to the molecular heterogeneity of four banding types of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L.', *Plant Molecular Biology*, 3(6). doi: 10.1007/bf00033381.
- Liu, B., Zhang, N., Zhao, S., Chang, J., Wang, Z., Zhang, G., Si, H. and Wang, D. (2015) 'Proteomic changes during tuber dormancy release process revealed by iTRAQ quantitative proteomics in potato', *Plant Physiology and Biochemistry*, 86. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.12.003.
- Liu, Y.-W., Han, C.-H., Lee, M.-H., Hsu, F.-L. and Hou, W.-C. (2003) 'Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum* L.), exhibits antioxidant activity in vitro', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15). doi: 10.1021/jf030016j.

- López-Pedrouso, M., Alonso, J. and Zapata, C. (2014b) 'Evidence for phosphorylation of the major seed storage protein of the common bean and its phosphorylation-dependent degradation during germination', *Plant Molecular Biology*, 84(4–5). doi: 10.1007/s11103-013-0141-1.
- López-Pedrouso, M., Bernal, J., Franco, D. and Zapata, C. (2014a) 'Evaluating two-dimensional electrophoresis profiles of the protein phaseolin as markers of genetic differentiation and seed protein quality in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29). doi: 10.1021/jf502439u.
- López-Pedrouso, M., Lorenzo, J. M., Zapata, C. and Franco, D. (2019). 'Proteins and amino acids', in Innovative thermal and non-thermal processing, bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds. Woodhead Publishing – Sawston, UK.
- López-Pedrouso, M., Pérez-Santaescolástica, C., Franco, D., Fulladosa, E., Carballo, J., Zapata, C. and Lorenzo, J. M. (2018) 'Comparative proteomic profiling of myofibrillar proteins in dry-cured ham with different proteolysis indices and adhesiveness', *Food Chemistry*, 244. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.068.
- López-Torrejón, G., Salcedo, G., Martín-Esteban, M., Díaz-Perales, A., Pascual, C. Y. and Sánchez-Monge, R. (2003) 'Len c 1, a major allergen and vicilin from lentil seeds', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(6). doi: 10.1016/j.jaci.2003.08.035.
- Ludwików, A. (2015) 'Targeting proteins for proteasomal degradation, a new function of *Arabidopsis* ABI1 protein phosphatase 2C', *Frontiers in Plant Science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00310.
- Lund, G., Ciceri, P. and Viotti, A. (1995) 'Maternal-specific demethylation and expression of specific alleles of zein genes in the endosperm of *Zea mays* L.', *The Plant Journal*, 8(4). doi: 10.1046/j.1365-313x.1995.8040571.x.
- M'Hamdi, M., Beji, H., Belbahri, L., Bettaieb, T., Kouki, K., Harbaoui, Y. (2009) 'Hydrogen peroxide and a catalase, physiological

- regulators of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber dormancy', *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1.
- Machida-Hirano, R. (2015) 'Diversity of potato genetic resources', *Breeding Science*, 65(1). doi: 10.1270/jsbbs.65.26.
- Mani, F., Bettaieb, T., Doudech, N., Hannachi, C. (2014) 'Physiological mechanisms for potato dormancy release and sprouting: A review', *African Crop Science Journal*, 22(2).
- Marla, S., Bharatiya, D., Bala, M., Singh, V. and Kumar, A. (2010) 'Classification of rice seed storage proteins using neural networks', *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 19(1). doi: 10.1007/bf03323450.
- Marsh, J. T., Tryfona, T., Powers, S.J., Stephens, E., Dupree, P., Shewry, P. R. and Lovegrove, A. (2011) 'Determination of the N-glycosylation patterns of seed proteins: applications to determine the authenticity and substantial equivalence of genetically modified (GM) crops', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16). doi: 10.1021/jf2010854.
- Mehta-D'souza, P. (2012) 'Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels using Pro-Q Emerald 300 Dye, a fluorescent periodate schiff-base stain', *Methods in Molecular Biology*, 869. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_50.
- Meyer, L. J., Gao, J., Xu, D. and Thelen, J. J. (2012) 'Phosphoproteomic analysis of seed maturation in Arabidopsis, rapeseed, and soybean', *Plant Physiology*, 159(1). doi: 10.1104/pp.111.191700.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. and Noctor, G. (2010) 'Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models', *Journal of Experimental Botany*, 61(15). doi: 10.1093/jxb/erq282.
- Miernyk, J. A. (2014) 'Seed Proteomics', in Plant proteomics. Humana Press - New York.

- Miernyk, J. A. and Hajduch, M. (2011) 'Seed proteomics', *Journal of Proteomics*, 74(4). doi: 10.1016/j.jprot.2010.12.004.
- Mignery, G. A., Pikaard, C. S. and Park, W. D. (1988) 'Molecular characterization of the patatin multigene family of potato', *Gene*, 62(1). doi: 10.1016/0378-1119(88)90577-X.
- Mignery, G. A., Pikaard, C. S., Hannapel, D. J. and Park, W. D. (1984) 'Isolation and sequence analysis of cDNAs for the major potato tuber protein, patatin', *Nucleic Acids Research*, 12(21). doi: 10.1093/nar/12.21.7987.
- Miranda, M. L. and Aguilera, J. M. (2006) 'Structure and texture properties of fried potato products', *Food Reviews International*, 22(2). doi: 10.1080/87559120600574584.
- Mitrus, J., Stankiewicz, C., Steć, E., Kamecki, M. and Starczewski, J. (2003) 'The influence of selected cultivation on the content of total protein and amino acids in the potato tubers', *Plant, Soil and Environment*, 49(3). doi: 10.17221/4102-pse.
- Montenarh, M. and Götz, C. (2018) 'Ecto-protein kinase CK2, the neglected form of CK2 (Review)', *Biomedical Reports*, 65. doi: 10.3892/br.2018.1069.
- Montillet, J., Cacas, J., Garnier, L., Montané, M., Douki, T., Bessoule, J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, J., Vial, A. *et al.* (2004) 'The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses', *The Plant Journal*, 40(3). doi: 10.1111/j.1365-313x.2004.02223.x.
- Montoya, C. A., Leterme, P., Victoria, N. F., Toro, O., Souffrant, W. B., Beebe, S. and Lallès, J.-P. (2008) 'Susceptibility of phaseolin to in vitro proteolysis is highly variable across common bean varieties (*Phaseolus vulgaris*)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6). doi: 10.1021/jf072576e.
- Morcillo, R. J. L., Navarrete, M. I. T., Bote, J. A. O., Monguio, S. P. and García-Garrido, J. M. (2016) 'Suppression of allene oxide synthase 3 in potato increases degree of arbuscular mycorrhizal

- fungal colonization', *Journal of Plant Physiology*, 190. doi: 10.1016/j.jplph.2015.11.003.
- Morelli, J. K., Zhou, W., Yu, J., Lu, C. and Vayda, M. E. (1998) 'Actin depolymerization affects stress-induced translational activity of potato tuber tissue', *Plant Physiology*, 116(4). doi: 10.1104/pp.116.4.1227.
- Mouzo, D., Bernal, J., López-Pedrouso, M., Franco, D. and Zapata, C. (2018a) 'Advances in the biology of seed and vegetative storage proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry', *Molecules*, 23(10). doi: 10.3390/molecules23102462.
- Mouzo, D., López-Pedrouso, M., Bernal, J., García, L., Franco, D. and Zapata, C. (2018b) 'Association of patatin-based proteomic distances with potato (*Solanum tuberosum* L.) quality traits', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(44). doi: 10.1021/acs.jafc.8b03203.
- Mulekar, J. J. and Huq, E. (2014) 'Expanding roles of protein kinase CK2 in regulating plant growth and development', *Journal of Experimental Botany*, 65(11). doi: 10.1093/jxb/ert401.
- Müntz, K. (1998) 'Deposition of storage proteins', *Plant Molecular Biology*, 38. doi: 10.1023/a:1006020208380.
- Murniece, I., Karklina, D., Galoburda, R., Santare, D., Skrabule, I. and Costa, H. S. (2011) 'Nutritional composition of freshly harvested and stored Latvian potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties depending on traditional cooking methods', *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4–5). doi: 10.1016/j.jfca.2010.09.005.
- Navarre, R. and Pavek, M. J. (2014) 'The potato: botany, production and uses', Cabi - Boston, USA.
- Ncobela, C. N., Kanengoni, A. T., Hlatini, V. A., Thomas, R. S. and Chimonyo, M. (2017) 'A review of the utility of potato by-products as a feed resource for smallholder pig production', *Animal Feed*

- Science and Technology*, 227. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.02.008.
- Nei, M. and Li, W. H. (1979) 'Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10). doi: 10.1073/pnas.76.10.5269.
- Nguyen, T.-P., Cueff, G., Hegedus, D. D., Rajjou, L. and Bentsink, L. (2015) 'A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity', *Journal of Experimental Botany*, 66(20). doi: 10.1093/jxb/erv348.
- Ning, F., Wu, X., Zhang, H., Wu, Z., Niu, L., Yang, H. and Wang, W. (2017) 'Accumulation profiles of embryonic salt-soluble proteins in maize hybrids and parental lines indicate *Matroclinous* inheritance: A proteomic analysis', *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01824.
- O'Farrell, P. H. (1975) 'High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 250(10).
- Oda, T., Shimizu, K., Yamaguchi, A., Satoh, K. and Matsumoto, K. (2012) 'Hypothermia produces rat liver proteomic changes as in hibernating mammals but decreases endoplasmic reticulum chaperones', *Cryobiology*, 65(2). doi: 10.1016/j.cryobiol.2012.05.004.
- Ogawa, T., Tayama, E., Kitamura, K. and Kaizuma, N. (1989) 'Genetic improvement of seed storage proteins using three variant alleles of 7S globulin subunits in soybean (*Glycine max* L.)', *Japanese Journal of Breeding*, 39(2). doi: 10.1270/jsbbs1951.39.137.
- Olu, M. and Adediran, A. E. (2015) 'Protein evaluation of foods', *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 4(6). doi: 10.11648/j.ijnfs.20150406.26.
- Osborne, T. B. (1924) 'The Vegetable Proteins'. 2nd edn. Longmans - London.

- Oser, B. L. (1951) 'Method for integrating essential amino acid content in the nutritional evaluation of protein', *Journal of the American Dietetic Association*, 27(5).
- Paaren, H. E., Slightom, J. L., Hall, T. C., Inglist, A. S. and Blagrove, R. J. (1987) 'Purification of a seed glycoprotein: N-terminal and deglycosylation analysis of phaseolin', *Phytochemistry*, 26(2). doi: 10.1016/s0031-9422(00)81410-7.
- Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Vereda, A., Sirvent, S., Villalba, M. and Rodríguez, R. (2005) 'Isolation and identification of an 11S globulin as a new major allergen in mustard seeds', *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 94(5). doi: 10.1016/s1081-1206(10)61138-6.
- Park, Y., Choi, B. H., Kwak, J.-S., Kang, C.-W., Lim, H.-T., Cheong, H.-S. and Hahm, K.-S. (2005) 'Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung)', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16). doi: 10.1021/jf0505123.
- Pasiakos, S., Agarwal, S., Lieberman, H. and Fulgoni, V. (2015) 'Sources and amounts of animal, dairy, and plant protein intake of us adults in 2007–2010', *Nutrients*, 7(8). doi: 10.3390/nu7085322.
- Payne, P. I. (1987) 'Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality', *Annual Review of Plant Physiology*, 38(1). doi: 10.1146/annurev.pp.38.060187.001041.
- Pechanova, O. and Pechan, T. (2017). 'Proteomics as a tool to understand maize biology and to improve maize crop'. *Proteomics in Food Science*. doi: 10.1016/B978-0-12-804007-2.00003-5.
- Pego, J. V and Smeekens, S. C. M. (2000) 'Plant fructokinases: a sweet family get-together', *Trends in Plant Science*, 5(12). doi: 10.1016/s1360-1385(00)01783-0.
- Pfaff, E., Klingenberg, M. and Heldt, H. W. (1965) 'Unspecific permeation and specific exchange of adenine nucleotides in liver mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta*, 104(1). doi:

10.1016/0304-4165(65)90258-8.

- Pfister, B. and Zeeman, S. C. (2016) 'Formation of starch in plant cells', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(14). doi: 10.1007/s00018-016-2250-x.
- Picariello, G., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M. D. and Ferranti, P. (2013) 'Structural characterization of the N-glycosylation of individual soybean β -conglycinin subunits', *Journal of Chromatography A*, 1313. doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.014.
- Pieterse, L. and Judd, J. (2014) 'World catalogue of potato varieties'. 6th edn. Agrimedia - New Zealand.
- Pinheiro, C. B., Shah, M., Soares, E. L., Nogueira, F. C. S., Carvalho, P. C., Junqueira, M., Araújo, G. D. T., Soares, A. A., Domont, G. B. and Campos, F. A. P. (2013). 'Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L.'. *Journal of Proteome Research*, 12(11). doi: 10.1021/pr400515b.
- Pomeranz, Y. and Meloan, C. E. (1994) 'Ash and minerals', in Food analysis: theory and practice. Chapman & Hall - New York.
- Pots, A. M., Gruppen, H., Hessing, M., van Boekel, M. A. J. S. and Voragen, A. G. J. (1999) 'Isolation and characterization of patatin isoforms', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11). doi: 10.1021/jf981180n.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., van Koningsveld, G. A., van den Broek, L. A. M. and Voragen, A. G. J. (2003). 'The most abundant protease inhibitor in potato tuber (Cv. Elkana) is a serine protease inhibitor from the Kunitz family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17). doi: 10.1021/jf0212486.
- Prasad, A., Sedlářová, M., Kale, R. S. and Pospíšil, P. (2017) 'Lipoxygenase in singlet oxygen generation as a response to wounding: in vivo imaging in *Arabidopsis thaliana*', *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-09758-1.
- Qian, D., Tian, L. and Qu, L. (2015) 'Proteomic analysis of

- endoplasmic reticulum stress responses in rice seeds', *Scientific Reports*, 5(1). doi: 10.1038/srep14255.
- Quiroga, I., Regente, M., Pagnussat, L., Maldonado, A., Jorrín, J. and de la Canal, L. (2013) 'Phosphorylated 11S globulins in sunflower seeds', *Seed Science Research*, 23(3). doi: 10.1017/s0960258513000160.
- Rabilloud, T. (2014) 'How to use 2D gel electrophoresis in plant proteomics', in *Plant proteomics: methods and protocols*. Humana Press - New York, USA.
- Rabilloud, T. and Lelong, C. (2011) 'Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial', *Journal of Proteomics*, 74(10). doi: 10.1016/j.jprot.2011.05.040.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S. and Lelong, C. (2010) 'Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future', *Journal of Proteomics*, 73(11). doi: 10.1016/j.jprot.2010.05.016.
- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P. C., Belghazi, M., Job, C. and Job, D. (2008) 'Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: A Comparison between artificial and natural aging protocols', *Plant Physiology*, 148(1). doi: 10.1104/pp.108.123141.
- Ralet, M.-C. and Guéguen, J. (2000) 'Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties', *Food Science and Technology*, 33(5). doi: 10.1006/fstl.2000.0672.
- Ramadan, M. F. (2016) 'Potato lipids', in *Advance in potato chemistry and technology*. Academic Press - Cambridge.
- Reddy, P. S., Kumar, T. C., Reddy, M. N., Sarada, C. and Reddanna, P. (2000) 'Differential formation of octadecadienoic acid and octadecatrienoic acid products in control and injured/infected potato tubers', *Biochimica et Biophysica*, 1483(2). doi: 10.1016/s1388-1981(99)00191-2.
- Rodríguez-Vázquez, R., Mato, A., López-Pedrouso, M., Franco, D.,

- Sentandreu, M. A. and Zapata, C. (2020). 'Measuring quantitative proteomic distance between Spanish beef breeds'. *Food Chemistry*, 315. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126293.
- Ronning, C. M., Stegalkina, S. S., Ascenzi, R. A., Bougri, O., Hart, A. L., Utterbach, T. R., Vanaken, S. E., Riedmuller, S. B., White, J. A., Cho, J. *et al.* (2003) 'Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries', *Plant Physiology*, 131(2). doi: 10.1104/pp.013581.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A. G., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S. and Sánchez-Serrano, J. J. (1996) 'Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns', *Journal of Biological Chemistry*, 271(35). doi: 10.1074/jbc.271.35.21012.
- Sakamoto, D., Nakamura, Y., Sugiura, H., Sugiura, T., Asakura, T., Yokoyama, M. and Moriguchi, T. (2010) 'Effect of 9-Hydroxy-10-oxo-12(Z), 15(Z)-octadecadienoic acid (KODA) on endodormancy breaking in flower buds of japanese pear', *HortScience*, 45(10). doi: 10.21273/hortsci.45.10.1470.
- Sano, N., Rajjou, L., North, H. M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A. and Seo, M. (2015) 'Staying alive: molecular aspects of seed longevity', *Plant and Cell Physiology*, 57(4). doi: 10.1093/pcp/pcv186.
- Santos, C. N., Alves, M., Oliveira, A. and Ferreira, R. B. (2013) ' β -N-Acetylhexosaminidase involvement in α -conglutin mobilization in *Lupinus albus*', *Journal of Plant Physiology*, 170(12). doi: 10.1016/j.jplph.2013.03.009.
- Saravanan, R. S. and Rose, J. K. C. (2004) 'A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues', *Proteomics*, 4(9). doi: 10.1002/pmic.200300789.
- Schaafsma, G. (2005) 'The protein digestibility-corrected amino acid

- score (PDCAAS) - A concept for describing protein quality in foods and food ingredients: A critical review', *Journal of AOAC International*, 88(3). doi: 10.1093/jaoac/88.3.988.
- Schatzki, J., Ecke, W., Becker, H. C. and Möllers, C. (2014) 'Mapping of QTL for the seed storage proteins cruciferin and napin in a winter oilseed rape doubled haploid population and their inheritance in relation to other seed traits', *Theoretical and Applied Genetics*, 127(5). doi: 10.1007/s00122-014-2292-0.
- Schiarea, S., Arnoldi, L., Fanelli, R., De Combarieu, E. and Chiabrando, C. (2013) 'In-depth glycoproteomic characterization of γ -conglutin by high-resolution accurate mass spectrometry', *PLoS ONE*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0073906.
- Schmidt, J. M., Damgaard, H., Greve-Poulsen, M., Larsen, L. B. and Hammershøj, M. (2018) 'Foam and emulsion properties of potato protein isolate and purified fractions', *Food Hydrocolloids*, 74. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.07.032.
- Scippa, G.S., Rocco, M., Iallicco, M., Trupiano, D., Viscosi, V., Di Michele, M., Arena, S., Chiatante, D. and Scaloni, A. (2010) 'The proteome of lentil (*Lens culinaris* Medik.) seeds: Discriminating between landraces', *Electrophoresis*, 31(3). doi: 10.1002/elps.200900459.
- Senakoon, W., Nuchadomrong, S., Chiou, R. Y.-Y., Senawong, G., Jogloy, S., Songsri, P. and Patanothai, A. (2015) 'Identification of peanut seed prolamins with an antifungal role by 2D-GE and drought treatment', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(11). doi: 10.1080/09168451.2015.1056508.
- Sengupta, C., Deluca, V., Bailey, D. S. and Verma, D. P. S. (1981) 'Post-translational processing of 7S and 11S components of soybean storage proteins', *Plant Molecular Biology*, 1(1). doi: 10.1007/bf00023011.
- Shekhar, S., Agrawal, L., Mishra, D., Buragohain, A. K., Unnikrishnan, M., Mohan, C., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. (2016)

- ‘Ectopic expression of amaranth seed storage albumin modulates photoassimilate transport and nutrient acquisition in sweetpotato’, *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep25384.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) ‘Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels’, *Analytical Chemistry*, 68(5). doi: 10.1021/ac950914h.
- Shewry, P. R. (2003) ‘Tuber storage proteins’, *Annals of Botany*, 91(7). doi: 10.1093/aob/mcg084.
- Shewry, P. R. and Halford, N. G. (2002) ‘Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization’, *Journal of Experimental Botany*, 53(370). doi: 10.1093/jexbot/53.370.947.
- Shewry, P. R. and Tatham, A. S. (1990) ‘The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution’, *Biochemical Journal*, 267(1). doi: 10.1042/bj2670001.
- Shewry, P. R., Napier, J. A. and Tatham, A. S. (1995) ‘Seed storage proteins: structures and biosynthesis.’, *The Plant Cell*, 7(7). doi: 10.1105/tpc.7.7.945.
- Shilov, I. V., Seymour, S. L., Patel, A. A., Loboda, A., Tang, W. H., Keating, S. P., Hunter, C. L., Nuwaysir, L. M. and Schaeffer, D. A. (2007) ‘The paragon algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra’, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9). doi: 10.1074/mcp.t600050-mcp200.
- Silva, F., Nogueira, L. C., Gonçalves, C., Ferreira, A. A., Ferreira, I. and Teixeira, N. (2008) ‘Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties’, *Food Chemistry*, 106(2). doi: 10.1016/j.foodchem.2007.06.047.
- Silva-Sanchez, C., Li, H. and Chen, S. (2015) ‘Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics’, *Proteomics*, 15(5–6). doi:

10.1002/pmic.201400410.

- Simmonds, N. W. (1964) 'Studies of the tetraploid potatoes', *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, 59(376). doi: 10.1111/j.1095-8339.1964.tb00044.x.
- Singh, P. K., Shrivastava, N., Chaturvedi, K., Sharma, B. and Bhagyawant, S. S. (2016) 'Characterization of seed storage proteins from chickpea using 2D electrophoresis coupled with mass spectrometry', *Biochemistry Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/1049462.
- Sonnevald, S. and Sonnevald, U. (2014) 'Regulation of potato tuber sprouting', *Planta*, 239(1). doi: 10.1007/s00425-013-1968-z.
- Sonnevald, U., Sturm, A., Chrispeels, M. J. and Willmitzer, L. (1989) 'Targeting and glycosylation of patatin the major potato tuber protein in leaves of transgenic tobacco', *Planta*, 179(2). doi: 10.1007/bf00393687.
- Sorce, C., Lombardi, L., Giorgetti, L., Parisi, B., Ranalli, P. and Lorenzi, R. (2009) 'Indoleacetic acid concentration and metabolism changes during bud development in tubers of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars', *Journal of Plant Physiology*, 166(10). doi: 10.1016/j.jplph.2008.12.003.
- Spooner, D. M., Ghislain, M., Simon, R., Jansky, S. H. and Gavrilenko, T. (2014) 'Systematics, diversity, genetics, and evolution of wild and cultivated potatoes', *The Botanical Review*, 80(4). doi: 10.1007/s12229-014-9146-y.
- Spooner, D. M., McLean, K., Ramsay, G., Waugh, R. and Bryan, G. J. (2005) 'A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41). doi: 10.1073/pnas.0507400102.
- Strætkevorn, K. O., Schwarz, J. G., Wiesenborn, D. P., Zafirakos, E. and Lihme, A. (1999) 'Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice', *Bioseparation*, 7(6). doi:

10.1023/a:1008161618599.

- Strasser, R. (2014) 'Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology', *Frontiers in Plant Science*, 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00363.
- Strasser, R. (2016) 'Plant protein glycosylation', *Glycobiology*, 26(9). doi: 10.1093/glycob/cww023.
- Stumpe, M., Göbel, C., Demchenko, K., Hoffmann, M., Klösken, R. B., Pawlowski, K. and Feussner, I. (2006) 'Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of α -ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato', *The Plant Journal*, 47(6). doi: 10.1111/j.1365-313x.2006.02843.x.
- Stupar, R. M., Beaubien, K. A., Jin, W., Song, J., Lee, M.-K., Wu, C., Zhang, H.-B., Han, B. and Jiang, J. (2006) 'Structural diversity and differential transcription of the patatin multicopy gene family during potato tuber development', *Genetics*, 172(2). doi: 10.1534/genetics.105.051219.
- Sturm, A. Van Kuik, J. A., Vliegenthart, J. F., Chrispeels, M. J. (1987) 'Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin', *Journal of Biological Chemistry*, 262(28).
- Sugliani, M., Rajjou, L., Clercx, E. J. M., Koornneef, M. and Soppe, W. J. J. (2009) 'Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants abscisic acid insensitive3-5 (abi3-5) and leafy cotyledon1-3 (lec1-3)', *New Phytologist*, 184(4). doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03023.x.
- Suttle, J. C. (2004) 'Involvement of endogenous gibberellins in potato tuber dormancy and early sprout growth: a critical assessment', *Journal of Plant Physiology*, 161(2). doi: 10.1078/0176-1617-01222.
- Suttle, J. C. (2007) 'Dormancy and sprouting', in *Potato biology and biotechnology*. Elsevier - London.

- Suttle, J. C., Campbell, M. A. and Olsen, N. L. (2016) 'Potato tuber dormancy and postharvest sprout control', in *Postharvest ripening physiology of crops*. CRC Press - Boca Raton.
- Tan, F., Li, G., Chitteti, B. R. and Peng, Z. (2007). 'Proteome and phosphoproteome analysis of chromatin associated proteins in rice (*Oryza sativa*)'. *Proteomics*, 7(24). doi: 10.1002/pmic.200700580.
- Tang, W. H., Shilov, I. V and Seymour, S. L. (2008) 'Nonlinear fitting method for determining local false discovery rates from decoy database searches', *Journal of Proteome Research*, 7(9). doi: 10.1021/pr070492f.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. and Törnqvist, M. (2002) 'Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17). doi: 10.1021/jf020302f.
- Teper-Bamnolker, P., Buskila, Y., Lopesco, Y., Ben-Dor, S., Saad, I., Holdengreber, V., Zemach, H., Ori, N., Lers, A. *et al.* (2012) 'Release of apical dominance in potato tuber is accompanied by programmed cell death in the apical bud meristem', *Plant Physiology*, 158(4). doi: 10.1104/pp.112.194076.
- The Potato Genome Sequencing Consortium. (2011) 'Genome sequence and analysis of the tuber crop potato', *Nature*, 475(7355). doi: 10.1038/nature10158.
- Tian, J., Chen, J., Ye, X. and Chen, S.. (2016) 'Health benefits of the potato affected by domestic cooking: A review', *Food Chemistry*, 202. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.120.
- Tilley, K. A. and Schofield, J. D. (1995) 'Detection of phosphotyrosine in the high Mr subunits of wheat glutenin', *Journal of Cereal Science*, 22(1). doi: 10.1016/s0733-5210(05)80003-7.
- Tuzet, A., Rahantaniaina, M.-S. and Noctor, G. (2019) 'Analyzing the function of catalase and the ascorbate–glutathione pathway in H₂O₂ processing: insights from an experimentally constrained kinetic model', *Antioxidants & Redox Signaling*, 30(9). doi:

10.1089/ars.2018.7601.

- Tyers, M. and Mann, M. (2003) 'From genomics to proteomics', *Nature*, 422(6928). doi: 10.1038/nature01510.
- Urbany, C., Colby, T., Stich, B., Schmidt, L., Schmidt, J. and Gebhardt, C. (2011) 'Analysis of natural variation of the potato tuber proteome reveals novel candidate genes for tuber bruising', *Journal of Proteome Research*, 11(2). doi: 10.1021/pr2006186.
- USDA (2019) 'Food composition database', United States Department of Agriculture. Available at: <https://ndb.nal.usda.gov>.
- van den Berg, J. H., Ewing, E. E., Plaisted, R. L., McMurry, S. and Bonierbale, M. W. (1996) 'QTL analysis of potato tuber dormancy', *Theoretical and Applied Genetics*, 93(3). doi: 10.1007/bf00223171.
- van den Broeck, H. C., Gilissen, L. J. W. J., Smulders, M. J. M., van der Meer, I. M. and Hamer, R. J. (2011). 'Dough quality of bread wheat lacking α -gliadins with celiac disease epitopes and addition of celiac-safe avenins to improve dough quality'. *Journal of Cereal Science*, 53(2). doi: 10.1016/j.jcs.2010.12.004.
- van Koningsveld, G. A., Walstra, P., Gruppen, H., Wijngaards, G., van Boekel, M. A. J. S. and Voragen, A. G. J. (2002) 'Formation and stability of foam made with various potato protein preparations', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26). doi: 10.1021/jf025587a.
- van Vliet, S., Burd, N. A. and van Loon, L. J. C. (2015) 'The skeletal muscle anabolic response to plant- versus animal-based protein consumption', *The Journal of Nutrition*, 145(9). doi: 10.3945/jn.114.204305.
- Vaz, A. C., Pinheiro, C., Martins, J. M. N. and Ricardo, C. P. P. (2004) 'Cultivar discrimination of portuguese *Lupinus albus* by seed protein electrophoresis: the importance of considering "glutelins" and glycoproteins', *Field Crops Research*, 87(1). doi: 10.1016/j.fcr.2003.09.006.

- Vilela, B., Pagès, M. and Riera, M. (2015) 'Emerging roles of protein kinase CK2 in abscisic acid signaling', *Frontiers in Plant Science*, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00966.
- Viola, R., Pelloux, J., van der Ploeg, A., Gillespie, T., Marquis, N., Roberts, A.G. and Hancock, R.D. (2007) 'Symplastic connection is required for bud outgrowth following dormancy in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers', *Plant, Cell & Environment*, 30(8). doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01692.x.
- Vreugdenhil, D. and Struik, P. C. (1989) 'An integrated view of the hormonal regulation of tuber formation in potato (*Solanum tuberosum*)', *Physiologia Plantarum*, 75(4). doi: 10.1111/j.1399-3054.1989.tb05619.x.
- Waglay, A. and Karboune, S. (2016) 'Potato proteins: Functional food ingredients', in *Advances in potato chemistry and technology*. Academic Press - Cambridge.
- Waglay, A., Karboune, S. and Alli, I. (2014) 'Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties', *Food Chemistry*, 142. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.060.
- Waldron, K. W. (2004) 'Plant structure and fruit and vegetable texture', *Texture in food*. Woodhead Publishing Limited - Cambridge, UK.
- Wan, L., Ross, A. R. S., Yang, J., Hegedus, D. D. and Kermode, A. R. (2007) 'Phosphorylation of the 12 S globulin cruciferin in wild-type and abi1-1 mutant *Arabidopsis thaliana* (thale cress) seeds', *Biochemical Journal*, 404(2). doi: 10.1042/bj20061569.
- Wang, D., Cheng, L., Wang, Y. and Zhang, F. (2018) 'Comparative proteomic analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization in vitro regulated by IAA', *American Journal of Potato Research*, 95(4). doi: 10.1007/s12230-018-9640-6.
- Wang, F., Li, F. and Wang, J. (2013) 'Genetic diversity of chinese and CIP potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm assessed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers', *Potato Research*, 56(3). doi: 10.1007/s11540-013-9238-9.

- Wang, L. L. and Xiong, Y. L. (2005) 'Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23). doi: 10.1021/jf051213g.
- Wang, M., Heimovaara-Dijkstra, S. and Van Duijn, B. (1995) 'Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid', *Planta*, 195(4). doi: 10.1007/bf00195719.
- Wang, Y., Brandt, T. L. and Olsen, N. L. (2016) 'A Historical look at russet burbank potato (*Solanum tuberosum* L.) quality under different storage regimes', *American Journal of Potato Research*, 93(5). doi: 10.1007/s12230-016-9524-6.
- Watanabe, K. (2015) 'Potato genetics, genomics, and applications', *Breeding Science*, 65(1). doi: 10.1270/jsbbs.65.53.
- Weber, E., Manteuffel, R., Jakubek, M. and Neumann, D. (1981) 'Comparative studies on protein bodies and storage proteins of *Pisum sativum* L. and *Vicia faba* L.', *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 176(4). doi: 10.1016/s0015-3796(81)80048-0.
- Weiss, W. and Görg, A. (2007) 'Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics', in *Plant proteomics: methods and protocols*. Humana Press - New Jersey.
- Wheelock, A. M. and Wheelock, C. E. (2008) 'Bioinformatics in gel-based proteomics', in *Plant proteomics: technologies, strategies and applications*. John Wiley & Sons - Hoboken, USA.
- Wiberley-Bradford, A. E., Busse, J. S., Jiang, J. and Bethke, P. C. (2014) 'Sugar metabolism, chip color, invertase activity, and gene expression during long-term cold storage of potato (*Solanum tuberosum*) tubers from wild-type and vacuolar invertase silencing lines of Katahdin', *BMC Research Notes*, 7(1). doi: 10.1186/1756-0500-7-801.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. and Williams, K. L. (1996) 'Progress

- with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it', *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1). doi: 10.1080/02648725.1996.10647923.
- Wu, S., Ning, F., Zhang, Q., Wu, X. and Wang, W. (2017). 'Enhancing omics research of crop responses to drought under field conditions'. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00174.
- Xie, Z., Wang, C., Wang, K., Wang, S., Li, X., Zhang, Z., Ma, W. and Yan, Y. (2010) 'Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in α -gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.)', *Theoretical and Applied Genetics*, 121(7). doi: 10.1007/s00122-010-1384-8.
- Yadav, D. and Singh, N. K. (2011) 'Wheat tritacin: a potential target for nutritional quality improvement', *Asian Journal of Biotechnology*, 3(1). doi: 10.3923/ajbkr.2011.1.21.
- Yahata, E., Maruyama-Funatsuki, W., Nishio, Z., Tabiki, T., Takata, K., Yamamoto, Y., Tanida, M. and Saruyama, H. (2005) 'Wheat cultivar-specific proteins in grain revealed by 2-DE and their application to cultivar identification of flour', *Proteomics*, 5(15). doi: 10.1002/pmic.200402103.
- Yekutieli, D. and Benjamini, Y. (2001) 'The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency', *The Annals of Statistics*, 29(4). doi: 10.1214/aos/1013699998.
- Yin, X., Wang, X. and Komatsu, S. (2018) 'Phosphoproteomics: protein phosphorylation in regulation of seed germination and plant growth', *Current Protein and Peptide Science*, 19(4). doi: 10.2174/1389203718666170209151048.
- Youle, R. J. and Huang, A. H. C. (1981) 'Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species', *American Journal of Botany*, 68(1). doi: 10.1002/j.1537-2197.1981.tb06354.x.

- Yu, J. W., Choi, J.-S., Upadhyaya, C. P., Kwon, S. O., Gururani, M. A., Nookaraju, A., Nam, J.-H., Choi, C.-W., Kim, S. I., Ajappala, H. *et al.* (2012) 'Dynamic proteomic profile of potato tuber during its in vitro development', *Plant Science*, 195. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.06.007.
- Zarkadas, C. G., Gagnon, C., Gleddie, S., Khanizadeh, S., Cober, E. R. and Guillemette, R. J. D. (2007) 'Assessment of the protein quality of fourteen soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis', *Food Research International*, 40(1). doi: 10.1016/j.foodres.2006.08.006.
- Zhang, C., Wang, P., Tang, D., Yang, Z., Lu, F., Qi, J., Tawari, N. R., Shang, Y., Li, C. and Huang, S. (2019) 'The genetic basis of inbreeding depression in potato', *Nature Genetics*, 51(3). doi: 10.1038/s41588-018-0319-1.
- Zhang, W., Sun, J., Zhao, G., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Zhao, H. and Zou, D. (2017) 'Association analysis of the glutelin synthesis genes GluA and GluB1 in a Japonica rice collection', *Molecular Breeding*, 37(10). doi: 10.1007/s11032-017-0726-5.
- Zhang, X. and Glaser, E. (2002) 'Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone', *Trends in Plant Science*, 7(1). doi: 10.1016/s1360-1385(01)02180-x.
- Zhang, Z., Wu, S., Stenoién, D. L. and Paša-Tolić, L. (2014) 'High-throughput proteomics', *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1). doi: 10.1146/annurev-anchem-071213-020216.
- Zhou, J., Liu, D., Deng, X., Zhen, S., Wang, Z. and Yan, Y. (2018) 'Effects of water deficit on breadmaking quality and storage protein compositions in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(11). doi: 10.1002/jsfa.8968.
- Zilic, S., Barac, M., Pesic, M., Crevar, M., Stanojevic, S., Nisavic, A., Saratlic, G. and Tolimir, M. (2010) 'Characterization of sunflower

seed and kernel proteins', *Helia*, 33(52). doi:
10.2298/hel1052103z.





ANEXOS

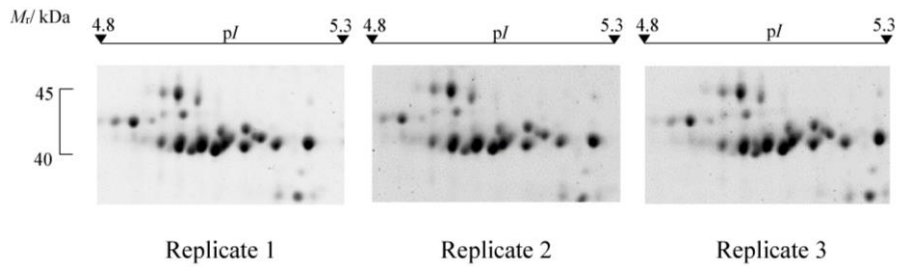


7 ANEXOS

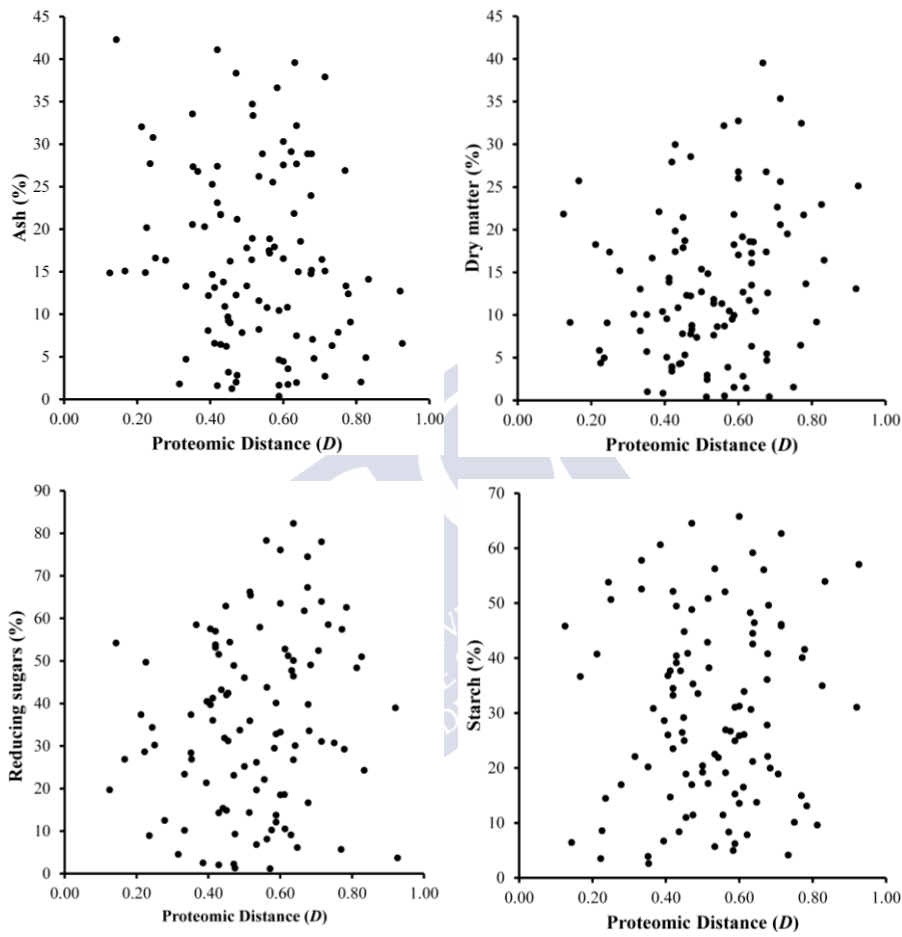
Anexo I. Relationship between Proteomic Distances (*D*) and Differences in the Content of Each Individual Amino Acid Across Pairs of Potato Cultivars

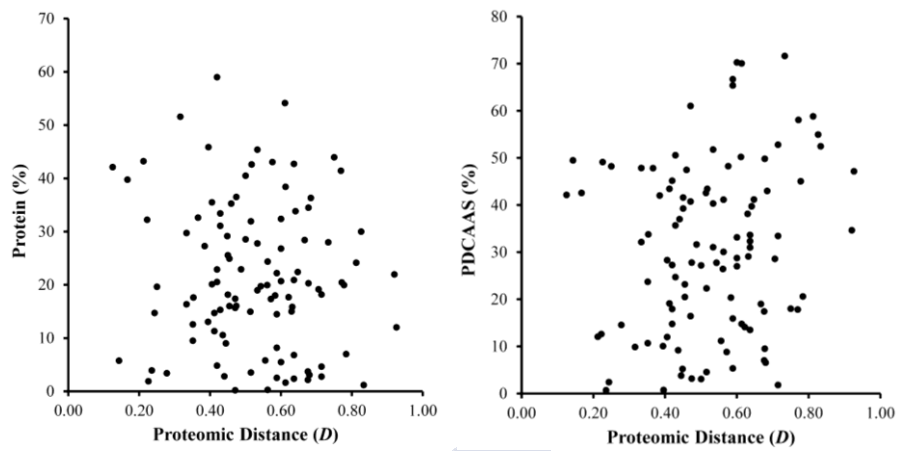
Amino acid		<i>r</i> ^a	<i>P</i> -value ^b
Essential amino acids (EAA)	His	+0.237	0.088
	Ile	+0.389	0.001
	Leu	+0.347	0.004
	Lys	+0.304	0.013
	Met	+0.013	1.000
	Phe	+0.154	0.453
	Thr	+0.317	0.010
	Val	+0.330	0.007
Non-essential amino acids (NEAA)	Ala	+0.171	0.364
	Arg	+0.174	0.364
	Asp	+0.058	1.000
	Cys	+0.154	0.453
	Glu	+0.447	0.000
	Gly	+0.292	0.018
	Pro	-0.202	0.204
	Ser	+0.388	0.001
	Tyr	+0.260	0.048

^aPearson product-moment correlation coefficient; Sample size (*n*) = 105. ^bAdjusted *P*-values by the Benjamini and Yekutieli method.⁵²



Anexo II. Reproducibility example of 2-DE patatin profiles using three biological replicates of cultivar Kennebec from different geographic location.





Anexo III. Relationship between proteomic distances (*D*) and differences in nutrient contents across pairs of potato cultivars

Anexo IV. Volume and confidence intervals for spots with statistically significant differential abundance.

Spot code	Agata		Kennebec		Agria		P-value		
	Volume	95% bootstrap CI (CL, CU)	Volume	95% bootstrap CI (CL, CU)	Volume	95% bootstrap CI (CL, CU)	AGA- KEN	AGA- AGR	KEN- AGR
1	1217 ± 137	(1057, 1627)	676 ± 53	(568, 773)	1445 ± 363	(678, 1997)	< 0.05		
2	5816 ± 1373	(3066, 8492)	1895 ± 120	(1655, 2112)	7114 ± 1014	(4979, 8681)	< 0.05		< 0.05
3	2058 ± 290	(1549, 2827)	3364 ± 69	(3234, 3527)	3387 ± 350	(2743, 4274)	< 0.05		
4	1414 ± 563	(625, 3054)					< 0.05	< 0.05	
5	752 ± 75	(616, 945)	899 ± 252	(445, 1544)				< 0.05	< 0.05
6	665 ± 114	(533, 863)	570 ± 57	(451, 659)	906 ± 110	(705, 1190)			< 0.05
7	533 ± 74	(386, 623)	792 ± 54	(693, 924)	726 ± 148	(563, 1014)	< 0.05		
8	5450 ± 457	(4716, 6731)	2559 ± 261	(2107, 3194)	4514 ± 858	(2695, 5706)	< 0.05		
9	915 ± 60	(800, 1057)	553 ± 111	(325, 738)	845 ± 152	(619, 1282)	< 0.05		
10	543 ± 65	(414, 654)	583 ± 31	(535, 671)				< 0.05	< 0.05
11	1149 ± 45	(1077, 1270)	868 ± 62	(764, 1026)	665 ± 36	(591, 724)	< 0.05	< 0.05	< 0.05
12	3448 ± 190	(3078, 3817)	2317 ± 178	(1945, 2628)	2607 ± 421	(1811, 3510)	< 0.05		

13	744 ± 34	(689, 839)	546 ± 53	(437, 632)	557 ± 55	(441, 636)	< 0.05	< 0.05
14	10520 ± 702	(9177, 12113)			11182 ± 1750	(7755, 15063)	< 0.05	< 0.05



